

Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

**Virologische Untersuchungen an Stieleichen
(*Quercus robur* L.) zum verursachenden
Pathogen der pfropfübertragbaren
chlorotischen Ringflecken**

Zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Landwirtschaft (Dr. rer. agr.)

Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät

Sabine Hahn

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Uwe Jens Nagel

Gutachter: 1. Prof. Dr. C. Büttner

2. Prof. Dr. H.-P. Mühlbach

eingereicht: 05.09.2005

Datum der Promotion: 05.12.2005

INHALT

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	10
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Material	17
2.1.1 Probenmaterial der Baumgattung Quercus	17
2.1.2 Indikatorpflanzen für Biotest und Virusvermehrung	19
2.1.3 Virusisolate	20
2.1.4 Bakterienstämme	20
2.1.5 Plasmide	20
2.1.6 Chemikalien und Enzyme	21
2.1.7 Polyklonale Antikörper	21
2.1.8 Nährmedien	21
2.1.9 Oligonukleotide	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Biotest und Übertragungswege	23
2.2.1.1 Mechanische Übertragung auf krautige Indikatorpflanzen	23
2.2.1.2 Überprüfung der Bodenübertragbarkeit durch das Fangpflanzenverfahren	24
2.2.1.3 Mechanische Übertragung auf Eichensämlinge	24
2.2.1.4 Untersuchungen zur Saatgutübertragbarkeit	25
2.2.2 Anreicherung putativer viraler Nukleokapside	25
2.2.3 Isolierung von putativen Viruspartikeln aus Pflanzenmaterial	26
2.2.3.1 Isolierung von Viruspartikeln aus Gehölzen	26
2.2.3.2 Isolierung von Viruspartikeln aus krautigen Pflanzen	29
2.2.4 Transmissionselektronenmikroskopie	30
2.2.5 Serologische Methoden	30
2.2.5.1 DAS-ELISA	
('Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked-Immunsorbent Assay')	30
2.2.5.2 Agargeldoppeldiffusionstest (Ouchterlony-Test)	31

2.2.5.3	Gelelektrophoretische Auftrennung und Färbung von Proteinen	31
2.2.6	Präparation von Nukleinsäuren	33
2.2.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA	33
2.2.6.2	Isolierung von doppelsträngiger (ds)-RNA	34
2.2.6.3	Eluierung von dsRNA und DNA aus Agarosegelen	37
2.2.6.4	Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen	38
2.2.6.5	Isolierung von Plasmid-DNA	38
2.2.6.7	Nukleinsäurefällung	40
2.2.6.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
2.2.6.9	Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	40
2.2.7	'Polymerase-Chain-Reaction' (PCR)	42
2.2.7.1	Reverse Transkription	42
2.2.7.2	IC-RT-PCR	43
2.2.7.3	Einsatzmengen und PCR-Bedingungen	43
2.2.8	Klonierung von PCR-Produkten	44
2.2.8.1	Ligation	44
2.2.8.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	44
2.2.8.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	44
2.2.8.4	Überprüfung rekombinanter Plasmide mittels Kolonie-PCR	45
2.2.8.5	Restriktionsanalyse isolierter Plasmid-DNA	45
2.2.8.6	Sequenzierung rekombinanter Plasmide und Auswertung	45
2.2.9	Klonierung der dsRNA und Nukleokapsid-assoziierten Nukleinsäure	46
2.2.9.1	Erststrangsynthese in Anlehnung an BENTHACK (2001)	46
2.2.9.2	Erststrangsynthese modifiziert nach JELKMANN et al. (1989)	46
2.2.9.3	Zweitstrangsynthese und Klonierung der cDNA	47
2.2.9.4	DOP-PCR modifiziert nach ROCHE (1999)	48
2.2.10	Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter Sonden	51
2.2.11	Spot-Blot	51
2.2.12	Northern-Blot und-Hybridisierung	51
2.2.13	Dot-Blot-Hybridisierung in Anlehnung an SAMBROOK et al. (1989)	53
3	ERGEBNISSE	54
3.1	Stieleichen mit virusverdächtigen Symptomen in Nord- und Mittel-deutschland	54

3.2	Untersuchungen zur Übertragbarkeit des Erregers	57
3.4	Anreicherung viraler Komponenten aus Stieleiche	61
3.4.1	Anreicherung von Viruspartikeln und Nachweis von Viren in einer RT-PCR	61
3.4.2	Anreicherung viraler Nukleokapside	63
3.4.3	Nachweis von Tobamo-Viren in Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken	64
3.5	Nukleinsäureanalysen	72
3.5.1	Gesamt-RNA-und Gesamtnukleinsäure-Isolierung	72
3.5.2	Isolierung viraler Replikationsintermediate (dsRNA-Isolierungen)	75
3.5.3	Partielle Charakterisierung isolierter dsRNA	82
3.5.5	Sequenzanalyse der klonierten dsRNA	91
3.6	Northern-Hybridisierung	97
4	DISKUSSION	98
	ZUSAMMENFASSUNG	132
	SUMMARY	134
	LITERATUR	137
	ANHANG 1	I
	ANHANG 2	IV
	ANHANG 3	VII
	ANHANG 4	X
	DANKSAGUNG	
	ERKLÄRUNG	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abt.	Abteilung
Acc. Nr.	'Accession Number'
ATP	Adenosintriphosphat
B	Berlin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaar
BSA	'Bovine Serum Albumin'
BSP	'Bark Storage Protein'
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
cDNA	'copy' Desoxyribonukleinsäure
cRNA	'copy' Ribonukleinsäure
DD	Dresden
DEPC	Diethylpyrocarbonsäure
DIECA	Diethylthiocarbonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOP-PCR	'Degenerate Oligonucleotide Primed' PCR
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ELISA	'Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay'
EM	Elektronenmikroskopie
Fa.	Firma
FA	Forstamt
Grah.	Graham
HH	Hamburg
H ₂ O _{DEPC}	DEPC-Wasser
H ₂ O _{Milli}	Reinstwasser
HPG	Hüllproteingen
(Init.) Denat.	(initiale) Denaturierung
IPTG	Isopropylthiogalactosid

Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
L.	Linné
LB	Luria Bertani
M	mosaikartige Blattverfärbungen
MCS	'Multiple Cloning Site'
Mill.	Miller
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MV	Mecklenburg-Vorpommern
Nb	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NBT	Nitrobenzolium
NCBI	'National Center of Biotechnology Information'
NS	Niedersachsen
NKR	nicht kodierende Region
NRW	Nordrhein-Westfalen
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
NY	New York
ORF	'Open Reading Frame', offener Leserahmen
P.	Partikel
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pos.	Position
PTGS	Posttranskriptionelles 'Gene-Silencing'
pulv.	pulversiert
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RdRp	RNA-abhängige-RNA-Polymerase
RF-C	chlorotische Ringflecken +Chlorosen
RFö	Revierförsterei
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
*S	Guanin, Cytosin
S	Scheckung

SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Staatsforst
SN	Sachsen
Solanum-t	<i>Solanum tuberosum</i>
Spec.	Spezies
SSC	Natriumchlorid-Natriumzitrat
ssRNA	einzelsträngige RNA
Stk	Stück
SWH	Schleswig-Holstein
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethyldiamin
TPG	Transportproteingen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	'Unit' (Enzymeinheit)
VSP	'Vegetative Storage Proteins'
v/v	Volumen/Volumen
var.	Varietät
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
Willd.	Willdenow
X-Gal	5-Bromo-4Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

Abkürzungen für Bakterien und Viren

AbMV	Abutilon mosaic bigeminivirus
ACLSV	Apple chlorotic leafspot trichovirus
ACV	Alfalfa cryptic alphacryptovirus
AhV	Atkinsonella hypoxylon 2H partitivirus
BBTV	Banana bunchy top nanavirus
BCV	Beet cryptic alphacryptovirus
BWYV	Beet western yellows luteovirus
BRV	Bovine rotavirus
CGMMV	Cucumber green mottle mosaic tobamovirus
CiLRV	Citrus leaf rugosevirus
CLRV	Cherry leaf roll nepovirus
CryptP.	Cryptosporidium parvum virus
CTV	Citrus tristeza closterovirus
CSSV	Cocoa swollen shoot badnavirus
DUGV	Dugbe nairovirus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EsRV	Eriochir sinensis virus
EV	Elderberry carlavirus
FDV	Fiji disease reovirus
FoMV	Foxtail mosaic potexvirus
FsV	Fusarium solani partitivirus
GAV	Gremmeniella abietina partitivirus
GfkV	Grapevine fleck virus
GFLV	Grapevine fanleaf nepovirus
IBDV	Infectious bursal disease virus
IPNV	Infectious pancreatic necrosis birnavirus
LCD	Little cherry disease closterovirus
MDMV	Maize dwarf mosaic potyvirus
MSV	Maize streak mastrevirus
ORSV	Odontoglossum ringspot tobamovirus
OV	Ophiostoma mitovirus
PaSV	Pangola stunt fijivirus
Phi6	Bacteriophage Phi 6 reovirus
PMMoV	Pepper mild mottle tobamovirus
PnCV	Poinsettia cryptic alphacryptovirus

PnMV	Poinsettia mosaic tymovirus
PVCV	Petunia vein clearing virus
PVX	Potato potexvirus X
PVY	Potato potyvirus Y
RYEV	Raddish yellow edge virus
RSPaV-1	Rupestris stem pitting associated virus-1
RYNV	Rubus yellow net virus
SMoV	Strawberry mottle virus
SPaV	Strawberry pallidosis virus
ScNV	Saccharomyces cerevisiae virus
SCSL1A	Saccharomyces cerevisiae virus L1A
SSV1	Sphaeropsis sapinea virus
TLV	Tatter leaf virus
TMV	Tobacco mosaic tobamovirus
TNV	Tobacco necrosis virus
ToMV	Tomato mosaic tobamovirus
TSWV	Tomato spotted wilt virus
TVMV	Tobacco vein mottling potyvirus
TYLCV	Tomato yellow leaf curl virus
VCV	Vicia cryptic virus
WCTeV	White clover temperate virus
WCCV 1	White clover cryptic virus

1 EINLEITUNG

Die Stieleiche (*Quercus robur* L.) gehört mit mehr als 200 weiteren Eichenarten zur Familie der *Fagaceae*. Ihr natürliches Verbreitungsgebiet umfasst den überwiegenden Teil Europas. Sie fehlt nur im Norden Schottlands, Russlands und Skandinaviens sowie in den sommertrockenen Gebieten des Südens (ERLBECK et al., 2002). Die Eiche zählt zu den besonders widerstandsfähigen Baumarten und kann unter natürlichen Verhältnissen in gutem Gesundheitszustand sehr alt werden.

Seit Beginn der achtziger Jahre werden jedoch zunehmend Schäden an europäischen Eichenbeständen beobachtet (SCHLAG, 1994). Im vergangenen Jahr lag der Anteil Eichen mit deutlichen Schäden im Kronenbereich bei 45 % (BMVEL, 2004). Neben klassischen Waldschadenssymptomen, wie der Kronenverlichtung und dem Abwerfen belaubter Astsprünge, wird zunehmend von stamm- und astbürtigen Angsttrieben, Blattverfärbungen, Vergilbungen, Kleinblättrigkeit sowie lokalen Rinden- und Kambiumnekrosen an Stamm und Ästen berichtet (THOMAS et al., 2002). Umfangreiche Untersuchungen zu den jeweiligen Schadursachen zeigen, dass die beobachteten Eichenschäden nicht monokausal bedingt sind, sondern durch einen Ursachenkomplex abiotischer und biotischer Einflussfaktoren hervorgerufen werden (FÜHRER, 1987; MARCU, 1987; LENTOVYC & CAPEK, 1987; VARGA, 1987; ECKSTEIN & DUJESIEFKEN, 1993; HAGER, 1993; HARTMANN et al., 1989; KOWALSKI, 1991; SCHLAG, 1994). Neben nicht parasitären Stressoren wie Luftschadstoffen, Klimaextrema und Stickstoffeutrophierung, sowie bedeutenden parasitären Schaderregern wie dem Eichenprachtkäfer (*Agrillus biguttatus*) und dem Eichenmehltau (*Microsphaera alphitoides*) sind Viren als prädisponierender Einflussfaktor anzunehmen (BUTIN, 1985; SCHLAG, 1994).

Die Bedeutung der Viren wird von NIENHAUS (1985a) in der Verfallsspirale der Gehölze dargestellt. Die äußerlich sichtbaren Symptome von Viruserkrankungen, wie Blattscheckungen, Mosaik und Ringflecken, werden vermutlich durch die Schädigung der Chloroplasten verursacht (QUADT, 1994). Chlorophylldefekte führen zu einer verminderten Photosyntheseleistung, die Wuchsdepressionen und eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber anderen Stressoren zur Folge haben. Demzufolge werden Viren als eine primäre Ursache für die Degeneration von Forstgehölzen angesehen, die meist erst dann krankheitsmitbestimmend werden, wenn die von ihnen ausgehende Prädisposition durch den Einfluss anderer biotischer und insbesondere abiotischer Stressoren verstärkt wird (QUADT, 1994; FÜHRLING & BÜTTNER, 1998). So konnten KONTZOG et al. (1990) am Wirt-Virusmodell *Betula pendula* (Roth.) infiziert mit Kirschenblattrollvirus (CLRV) zeigen, dass die zusätzliche Belastung durch Luftschadstoffe (Ozon und Schwefeldioxid) im Vergleich zu virusfreien Pflanzen zu einem signifikant geringerem

Zuwachs führt. In ihren Untersuchungen zu stoffwechselphysiologischen Veränderungen durch abiotische Stressoren an Forstgehölzen konnte FÜHRLING (1994) nachweisen, dass Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken und Scheckungen unter Ozoneinfluss oder bei Hitzeeinwirkung verstärkt zur Bildung von Nekrosen neigen.

Von virusverdächtigen Blattsymptomen an Eichen wird seit den 60er Jahren regelmäßig berichtet. KIRSTENSEN (1963) beschrieb erstmals Blattscheckungen an *Quercus rubra* (L.) in Dänemark. Diese Symptombild soll ebenfalls in Eichenbeständen Schwedens und Südinglands verbreitet sein (COPPER, 1979). SCHMELZER et al. (1966) berichteten wenig später von Fleckung und Blattdeformationen an *Quercus spp.* BLATTNY & PROCHAZKOVA (1966) beobachteten das gleiche Symptombild an Eichen in der Tschechoslowakei und stellten fest, dass sich das symptomverursachende Agens durch Pfropfung, Aphiden und Samen auf gesunde Eichensämlinge übertragen lässt. Chlorosen und nekrotische Läsionen zeigten YARWOOD & HECHT-POINER (1970) an Kalifornischen Steineichen (*Quercus agrifolia* Neé) und Weideneichen (*Quercus phellos* L.). Chlorotische Ringflecken wurden von BARNETT (1971) sowie KIM & FULTON (1973) an der Schwarzeiche (*Quercus marilandica* Muenchh.) in den USA beschrieben. Wenig später beobachtete NIENHAUS (1975) dieses charakteristische Symptombild an Traubeneichen (*Quercus petraea* Liebl.) im Rheinischen Schiefergebirge. BÜTTNER & FÜHRLING (1993) publizierten erstmals das Auftreten chlorotischer Ringflecken an Stieleichen (*Quercus robur* L.) in Norddeutschland. Eine Übertragung der Symptome war ausschließlich durch Pfropfung auf gesunde Eichensämlinge möglich. Die mechanische Übertragung auf krautige Indikatoren gelang nicht (NIENHAUS, 1975; BÜTTNER & FÜHRLING, 1993; FÜHRLING, 1994; BÜTTNER & FÜHRLING, 1996).

In Eichen mit den charakteristischen Blattsymptomen wurden bisher Viren verschiedener Morphologie beschrieben. KIM & FULTON (1973) konnten anhand elektronenoptischer Untersuchungen von Ultradünnschnitten flexible Partikeln mit einem Durchmesser von 13 nm in Zellen von Eichen mit chlorotischen Ringflecken zeigen. NIENHAUS (1985 b) beobachtete isometrische Viruspartikeln, ähnlich der von Nepoviren, in Blättern symptomtragender Stieleichen konnte diese jedoch nicht durch mechanische Inokulation übertragen. Am häufigsten wurden bisher *Tobacco mosaic virus* (TMV) bzw. TMV-ähnliche Partikeln in Eichen mit virusverdächtigen Symptomen beschrieben. SCHMELZER et al. (1966) wiesen TMV-ähnliche Viruspartikeln in symptomtragenden Eichen in Ostdeutschland nach, konnten diese jedoch nicht mechanisch übertragen. YARWOOD & HECHT-POINER (1970), HORVÁTH et al. (1975) sowie NIENHAUS (1975) konnten TMV aus Eichenblättern mit Scheckung, Fleckung, Mosaik und Deformationen isolieren. Überdies gelang es NIENHAUS & YARWOOD (1972) TMV in Knospen und jungen Blättern symptomloser *Quercus ssp.* und *Lithocarpus* nachzuweisen. Die mechanische Übertragung von TMV-Partikeln im Anschluss an eine Sephadexgel-

Ausschlusschromatographie auf verschiedene krautige Indikatoren beschreiben NIENHAUS & YARWOOD (1972) sowie NIENHAUS (1975). POLÁK et al. (1990) gelang die mechanische Übertragung von TMV aus Eichen auf *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun'. Die Übertragung von Tobamoviren durch den amerikanischen Eichenmehltau (*Sphaerotheca lanestris*) zeigten YARWOOD & HECHT-POINAR (1970, 1973) sowie NIENHAUS (1971). Der in Deutschland vorkommende Mehltau der Gattung *Microsphaera* scheint keine Vektorfunktion zu haben (NIENHAUS, 1975).

Das Symptombild der chlorotischen Ringflecken wurde bisher nicht mit TMV in Verbindung gebracht (KIM & FULTON, 1973; NIENHAUS, 1975; FÜHRLING, 1994). Es wird mit einer weiten Verbreitung von Tobamoviren in deutschen Eichenbeständen gerechnet, deren Konzentration in den Einzelproben allerdings gering zu sein scheint (NIENHAUS, 1975).

Da der Versuch der Charakterisierung des Erregers der Ringfleckigkeit mit serologischen und elektronenmikroskopischen Verfahren nicht gelungen ist, wird seit Mitte der 90er Jahre versucht, die Natur des Agens mit Hilfe von molekularbiologischen Techniken aufzuklären. Molekularbiologische Methoden bieten häufig die einzige Möglichkeit, einer Virusinfektion nachzugehen (DODDS et al., 1984; VALVERDE et al., 1990b; JELKMANN et al., 1992; KEIM-KONRAD & JELKMANN, 1996).

Können keine Viruspartikeln isoliert werden, kann möglicherweise ein Nachweis auf Basis von viraler Doppelstrang-(ds)RNA erfolgen (MORRIS & DODDS, 1979; DODDS & BAR-JOSEPH, 1983; MAISS et al., 1987; JELKMANN et al., 1989; GERMAN et al., 1992; FÜHRLING, 1994; CHOI & RANGLES, 1997). Doppelstrang-RNA entsteht während der Replikation eines RNA-Genoms (MATTHEWS, 1991). Etwa 90 % aller Pflanzenviren besitzen ein Einzelstrang-(ss)RNA-Genom. Diese bilden während ihrer Replikation genomische und subgenomische dsRNAs (ZAITLIN & HULL, 1987). Man unterscheidet dabei zwischen vollständig doppelsträngigen Formen und replikativen Intermediaten, die nur teilweise doppelhelikale Strukturen aufweisen (MATTHEWS, 1991). Isolierte dsRNA kann daher auf das Vorliegen einer Virusinfektion hinweisen (JORDAN et al., 1983; DODDS et al., 1984; VALVERDE et al., 1986; VALVERDE et al., 1990b). DsRNA beschränkt sich jedoch nicht allein auf die replikativen Zwischenformen von ssRNA-Viren. Es sind sowohl dsRNA-Viren als auch doppelsträngige Ribonukleinsäuren bekannt, die z.T. keine Symptome in ihrer Wirtspflanze verursachen. Seit 20 Jahren wird verstärkt über das Vorliegen von dsRNA-Molekülen in symptomlosen Pflanzen, wie Bohnen (WAKARCHUK & HAMILTON, 1985), Maniok (GABRIEL et al., 1987), Luzerne (FAIRBANKS et al., 1988), Erbsen (GRILL & GARGER, 1988; LEFEBRE et al., 1990; PFEIFFER et al., 1993; PFEIFFER, 1998), Pfeffer (VALVERDE & FONTENOT, 1990; VALVERDE et al., 1990a), Gerste (ZABALGOGEAZCOA & GILDOW, 1992), Reis (WANG et al., 1990; FUKUHARA, 1999; FUKUHARA et al., 1993, 1995; MORIYAMA, 1995, 1999 a, b; GIBBS et al., 2000), Avocado (COOK et al., 1994) und Algen (ISHIHARA et al.,

1992; KOGA et al., 1998, 2003) berichtet. Diese dsRNAs werden als endogene dsRNAs bezeichnet (MORIYAMA et al., 1996, 1999a, b). Sie liegen in niedriger Konzentration im pflanzlichen Gewebe vor, werden nicht von der Wirtspflanze kodiert und replizieren über ihre eigene RdRp. Ihre Verbreitung erfolgt ausschließlich vertikal und sie können nicht durch mechanische Inokulation übertragen werden (MORIYAMA et al., 1999 a, b; GIBBS et al., 2000). In ihrer Übertragungs- und Vermehrungsform sind sie den Plasmiden ähnlich und werden als dsRNA-Replikons bezeichnet. In jüngeren Untersuchungen wird auf Basis der Struktur und Morphologie zwischen verschiedenen Gruppen endogener dsRNA unterschieden. Hochmolekulargewichts-dsRNA >10 kb, wie in Reis und Erbsen beschrieben, werden den *Endoviridae* zugeordnet (MORIYAMA et al., 1999a, b; GIBBS et al., 2000; HORIUCHI et al., 2001; HORIUCHI & FUKUHARA, 2004). Phylogenetisch weisen sie die engste Verwandtschaft zu den +ssRNA-Alphaviren auf (PFEIFFER et al., 1993; PFEIFFER, 1998; GIBBS et al., 2000). GHABRIAL et al. (1994) sowie KOGA et al. (2003) beschreiben darüber hinaus dsRNA-Replikons in höheren Pflanzen, die im Gegensatz zu den Endornaviren ein wesentlich kleineres segmentiertes Genom von 1,4-3,0 kb besitzen und zudem isometrische Partikeln ausbilden. Die Autoren ordnen diese den Partitiviren zu.

DsRNA mit großer Ähnlichkeit zu den pflanzlichen dsRNA-Replikons auf genetischer und morphologischer Ebene wurden ebenso in Pilzen (NUSS & KOLTIN, 1990, GHABRIAL, 1994, OSAKI et al., 2002), Protozoen (WANG & WANG, 1991) und Insekten (MIYAZAKI et al., 1996) beschrieben. Dieser Aspekt macht die dsRNA-Replikons besonders für die evolutionäre Untersuchung von Viren interessant. LONSDALE (1986) vermutet, dass endogene dsRNAs von RNA-Viren abstammen. Nicht nur der Ursprung, auch die Funktion dieser endogenen dsRNAs sind bisher völlig unklar.

Neben den endogenen dsRNAs können in symptomlosen Pflanzen, wie Hopfen, Klee, Luzerne, Rüben und Senf kleinere dsRNA-Moleküle von kryptischen Viren vorliegen (ACCOTTO & BOCCARDO, 1986; ANTONIW et al., 1986; ACCOTTO et al., 1987, 1990; LOUISONI et al., 1987; BOCCARDO et al., 1985, 1987; KÜHNE et al., 1986, 1987; XIE et al., 1989, 1993; LUKÁCS, 1994). Diese sind nur in geringer Konzentration in den Wirtszellen zu finden und können weder durch Pfropfung noch durch mechanische Inokulation übertragen werden (DODDS et al., 1984). Es sind isometrische Partikeln von 25-35 nm, deren dsRNA in Fragmente von 1,5-3,0 kb segmentiert ist (BOCCARDO et al., 1987; GIBBS et al., 2000).

FÜHRLING (1994) vermutet eine Kontamination der Stieleichen mit kryptischen Viren, da die Autorin dsRNA der Größen 1,5-2,0 kb in Bäumen mit und ohne Symptomen nachwies, die als Doppelbanden auftraten. Diese dsRNA-Moleküle lagen in gleichmäßiger Konzentration in verschiedenen Pflanzenteilen vor, was für eine Vielzahl von Viren in Gehölzen untypisch ist (BÜTTNER & FÜHRLING, 1996; BÜTTNER et al., 1996). Kryptische Viren alleine kommen jedoch

nicht als Erreger der Ringfleckigkeit in Frage. Auch wenn die Anwesenheit von dsRNA in symptomlosen Pflanzen den dsRNA-Nachweis erschweren kann, ist es durch den Vergleich der dsRNA-Muster aus symptomlosen und symptomtragenden Pflanzen möglich, Hinweise auf ein infektiöses Virus zu erhalten. So konnten FÜHRLING (1994) sowie BÜTTNER et al. (1996) aus vereinzelt Blattproben erkrankter Stieleichen dsRNA-Moleküle mit Segmentlängen $> 3,4$ kb isolieren und nehmen daher eine Mischinfektion mit einem viralen, bisher unbekannten Krankheitserreger an. STEINMÖLLER et al. (2004) gelang es, isometrische Partikeln von 30-40 nm aus Blättern von Stieleichen mit Symptomen zu isolieren und bringen diese aufgrund ihrer Morphologie mit den vermuteten kryptischen Viren in Verbindung, ein Nachweis in symptomlosen Stieleichen gelang den Autoren nicht.

Die erkrankten Eichen kommen im Forst oft vergesellschaftet mit Ebereschen (*Sorbus aucuparia*) vor, die ähnliche Symptome, chlorotischen Ringflecken und Scheckungen, zeigen. Da die Übertragung von Viren durch Vektoren, sowie über Böden und Gewässer im Waldökosystem möglich ist, stellt sich die Frage, ob die virusverdächtigen Symptome an beiden Baumarten durch den gleichen Erreger verursacht werden. STEINMÖLLER et al. (2004) konnte mit spezifischen Primern für die Ringfleckigkeit der Eberesche in einer RT-PCR DNA-Fragmente aus Gesamt-RNA erkrankter Stieleichenblätter amplifizieren, deren Länge jedoch nicht mit den erwarteten Fragmenten übereinstimmten. Die Autoren vermuten, dass im Genom des bisher unbekannten Erregers der Ringfleckigkeit in Stieleichen Basensequenzen vorliegen, die denen des Erregers aus Ebereschen ähnlich sind. Eine unspezifische Bindung an pflanzliche RNA schloss die Autorin aus, da in symptomlosem Blattmaterial keine Fragmente amplifiziert wurden.

Die Charakterisierung des bisher unbekannten viralen Erregers in Stieleichen ist im Hinblick auf den ökonomischen Wert und die zunehmende ökologische Bedeutung dieser Baumart in unseren Wäldern von großem Interesse.

In der multifunktionalen Forstwirtschaft nimmt die Eiche betriebswirtschaftlich als Nutzholz einen hohen Stellenwert ein. Mit ihrem vielseitig verwendbaren Nutzholz bildet sie eine wichtige wirtschaftliche Grundlage für die Holzverarbeitende Industrie. Mit einem Flächenanteil von 10 % stellen Stiel- und Traubeneichen die vierthäufigste Baumgruppe in Deutschland dar (BMVEL, 2004). Für die Umwelt ist die Eiche von großer ökologischer Bedeutung. Sie trägt mit ihrer Sturmfestigkeit vor allem auf schwer kultivierbaren Böden zur Bestandesstabilisierung bei. Im Rahmen des von der Bundesregierung geforderten Waldumbaus zu standortgerechten Laub- und Laubmischwäldern werden die heimischen Eichenarten auch in Zukunft an Bedeutung gewinnen. Als Hauptbaumart im öffentlichen Grün besitzt die Eiche Wert für die Gesundheit und

das Wohlbefinden der Menschen. Ihre Langlebigkeit und ihr charakteristischer Habitus machen sie zu einem wertvollen Landschaftselement.

Viruserkrankungen beeinträchtigen die Vitalität und setzen die Widerstandskraft der Gehölze herab. Aufgrund der verringerten Photosyntheseleistung reicht die Regenerationsfähigkeit virusinfizierter Bäume oftmals nicht aus, um zusätzlich einwirkende Stressoren zu kompensieren, was sichtbare Schäden und Degenerationserscheinungen zur Folge hat (BÜTTNER et al., 1996). Virusinfizierte Gehölze stellen als vereinzelt Infektionsquellen im Forst langfristig ein sich ausbreitendes Virusreservoir dar. Untersuchungen von BÜTTNER (1993), FÜHRLING & BÜTTNER (1995) sowie BÜTTNER & FÜHRLING (1996) haben gezeigt, dass junges Pflanzenmaterial in Baumschulen bereits virusinfiziert sein kann. Dieses kann später nach Auspflanzung am Bestimmungsort im öffentlichen Grün gesunde Pflanzen über verschiedenste Wege infizieren. In diesem Zusammenhang ist der positive Befund der stabilen Tobamoviren, in Gewässern und Böden zahlreicher Ökosysteme für die Eichen von großer Bedeutung (BÜTTNER et al., 1996).

Strategien zur Sicherung der genetischen Vielfalt der Waldbäume und Sträucher zielen auf den Erhalt und die nachhaltige Nutzung der bestehenden genetischen Ressourcen. Die wichtigsten Maßnahmen zur Sicherung forstlicher Genressourcen sind Naturverjüngungen geeigneter Bestände sowie die Verwendung von geeignetem Vermehrungsgut für Pflanzungen (BMVEL, 2003; nationales Waldprogramm). Für die Lagerung und Vermehrung von Standort angepasstem Saatgut in Genbanken ist der Aspekt der Samenübertragbarkeit von Viren besonders zu berücksichtigen.

Im Hinblick auf die lange Kultivierung der Eichen müssen gesunde Pflanzenbestände angelegt werden. Voraussetzung dafür ist die Selektion auf virusfreies bzw. virusgetestetes Pflanzenmaterial in Baumschulen und Genbanken. Diese kann jedoch nur durch spezifische Testverfahren gelingen, für die die Charakterisierung des Erregers erforderlich ist. Diese kann speziell bei Gehölzen oft Jahre intensiver Forschung benötigen. Die Instabilität der Viruspartikeln, der geringe Virustiter und der hohe Gehalt an pflanzlichen Sekundärstoffen erschweren nicht nur die konventionelle Isolierung von Viruspartikeln und Übertragungsverfahren sondern beeinträchtigen ebenso die Isolierung von viraler dsRNA (DODDS et al., 1984; MAISS et al., 1987; REZAIAN et al., 1991; BÜTTNER et al., 1996; WERNER et al., 1997). Diese Arbeiten sind jedoch grundlegend für die Charakterisierung neuer bisher unbekannter Viren.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Verbreitung der Ringfleckigkeit an Stieleichen in Deutschland weiter zu dokumentieren. Mit Hilfe von serologischen, elektronenmikroskopischen und molekularbiologischen Methoden sollten zunächst die in den Voruntersuchungen

beschriebenen Viruspartikeln unterschiedlicher Morphologie näher charakterisiert werden. Dazu waren Viruspartikeln durch unterschiedliche z. T. modifizierte Aufreinigungsverfahren aus Blattmaterial mit verschiedenen Symptombildern anzureichern. Die Zugehörigkeit der von NIENHAUS (1985 b) und STEINMÖLLER et al. (2004) beobachteten isometrischen Partikeln aus Eichen zu CLRV bzw. die Verwandtschaft zum Erreger der Ebereschenringfleckigkeit sollte im RT-PCR-Verfahren mit spezifischen Primern für diese Viren getestet werden. Der Nachweis von Tobamoviren, die von SCHMELZER et al. (1966), YARWOOD & HECHT-POINAR (1970), HORVÁTH et al. (1975) sowie NIENHAUS (1975) in Eichen beschrieben worden sind, sollte sowohl auf serologischer als auch auf molekularbiologischer Basis erfolgen.

Für die nähere Beschreibung des unbekannten putativen Agens in Stieleichen mit virusverdächtigen Symptomen war die dsRNA-Isolierung für die Extraktion aus unterschiedlichen Geweben von Stieleichen zu optimieren. Diese sollte mit Hilfe der DOP-PCR bzw. der "klassischen" Klonierung von cDNA charakterisiert werden. Auf Basis der erhaltenen Sequenzinformationen sollten anschließende Genomanalysen und Verwandtschaftsstudien unter Anwendung geeigneter Software zur Identifizierung der dsRNA führen.

Ausgehend von den bereits von FÜHRLING (1994) beschriebenen hauptsächlich auftretenden dsRNA-Fragmenten von 1,5 kb bis 2,0 kb, ihrem Auftreten als Doppelbande sowie dem Vorkommen in symptomtragenden und symptomlosen Eichen war der Verdacht einer Kontamination mit kryptischen Viren aufzuklären.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial der Baumgattung *Quercus*

Bonituren und Probenahmen an Eichen wurden einmal jährlich in Nordrhein-Westfalen (NRW), Schleswig-Holstein (SWH), Niedersachsen (NS), Sachsen (SN) und Hamburg (HH) durchgeführt (Abb. 2.1). Um den Einfluss Jahreszeit- und Witterungsbedingter Symptomveränderungen auf die Übertragbarkeit des Agens und die Isolierung von dsRNA zu testen, wurden in Berlin und Umgebung mehrmals jährlich Blatt-, Knospen- und Rindenproben von Stieleichen mit virusverdächtigen Blattsymptomen (Ringflecken, Scheckung, Mosaik) und optisch gesund erscheinenden Eichen entnommen. Aufgrund der zunehmenden Maskierung der virusverdächtigen Symptome im Verlauf der Vegetationsperiode, wurden die Probenahmen hauptsächlich in den Monaten Mai und Juni durchgeführt. Das Probenmaterial wurde aus verschiedenen Kronenbereichen entnommen. Blattproben von Bäumen eines Standortes, die nur vereinzelt Symptome aufzeigten, wurden als "Sammelprobe" gelagert. Proben eines Baumes, die neben virusverdächtigen Symptomen Saugschäden durch die Eichenzwerglaus (*Phylloxera coccinea*) bzw. Mehltauinfektionen (*Microsphaera alphitoides*) aufwiesen, wurden als "Mischinfektionen" bezeichnet.

Rinden- und Knospenmaterial wurde im Februar an den Standorten Berlin-Grunewald (B 1) und Hamburg (HH, SF Klövensteen) entnommen. Für die Aufreinigung von dsRNA und Nukleokapsiden aus Rindengewebe wurde die Rinde mit Siebzellen und Kambium vom Holzteil abgezogen. Das Material wurde frisch eingesetzt oder bis zur Verarbeitung bei -20 °C bzw. -80 °C, oder in flüssigem Stickstoff pulverisiert bei -80 °C gelagert. In die Untersuchungen wurden Eichenblattproben einbezogen, welche in den Jahren 1993-1999 in Nordrhein-Westfalen entnommen und bei -20°C gelagert worden waren.

Die in der Arbeit verwendeten Eichenproben sind mit einer E-Nummer gekennzeichnet und werden in der Tab. A1, Anhang 4 mit Beschreibungen zum Pflanzenmaterial, zum Fundort, zur Symptomausprägung, zu den Lagerungsbedingungen sowie zur Verwendung und zum Ergebnis der Untersuchungen aufgeführt.

Zu den Probenahmestandorten gehörten ausgewählte Forstquartiere und Straßenzüge sowie eine Erhaltungssamenplantage. Tab. 2.1 zeigt die Probenahmestandorte unter Angabe der Art der Pflanzung, des Baumalters und des Boniturschemas. Die Lage der Standorte in Deutschland ist in Abb. 2.1 dargestellt, die bonitierten Flächen sind im Anhang A1, Abb. A1.1-A.1. 11 aufgeführt.

Tab. 2.1: Darstellung der Probenahmestandorte unter Angabe der Art der Pflanzung, dem Baumalter und des Boniturschemas

Nr.	Standort	Art der Pflanzung	Baumalter in Jahren	Boniturschema
1	B-Grunewald, Revierförsterei (RFö) Dachsberg (B 1)	Einzelgehölze	5-50	alle Stieleichen
2	B-Spandau, RFö Radeland (B 2)	zwei Reihen Stieleichen als Randbepflanzung	5-20	alle Stieleichen
3	B-Spandau, RFö Hakenfelde Oberjägerweg (B 3)	zwei Reihen Stieleichen als Randbepflanzung	25-50	alle Stieleichen
4	SWH, Forstamt (FA) Rantzau 102 A1	Randpflanzung mit Stieleichen	20	Stieleichen am Wegesrand
5	HH, Staatsforst (SF) Klövensteen	Randpflanzung mit Stieleichen	15-60	alle Stieleichen
6a	NS, (FA Neuenburg), RFö Hopels, Abt. 1496	Reihenpflanzung	20-30	Bonitur der Randgehölze
6b	NS, (FA Neuenburg), RFö Hopels, Abt. 1500	Nesterpflanzung, je 10 Stieleichen	13	3-5 Reihen
7	NS, (FA Braunschweig), RFö Kampen, 78 a ²	Reihenpflanzung	20	5 halbe Reihen
8	NRW, FA Arnsberg, Abt. 289 und 290	Randpflanzung mit Stieleichen	30-50	alle Stieleichen
9	NRW, Hauberg (Kreuztal)	Eichen- Birken-Mischwald	10-20	alle Stieleichen, Wegeränder
10	NRW, FA Hilchenbach Erhaltungssamenplantage	102 Parzellen, je 7 Stieleichen	13	alle Stieleichen
11	SN, FA Dresden Nord, Abt. 250 a ²	Randpflanzung mit Stieleichen	10-20	alle Stieleichen



Abb. 2.1 Probenahmestandorte (●) in Deutschland

2.1.2 Indikatorpflanzen für Biotest und Virusvermehrung

Für Untersuchungen zur Pathogenität des unbekannten Erregers der Ringfleckigkeit an Stieleichen wurden Pflanzenpresssäfte sowie teilgereinigte Eichenblatthomogenate mit Hilfe der mechanischen Inokulation auf krautige Testpflanzen übertragen, die für eine Vielzahl bekannter Viren geeignete Wirte darstellen. Diese Übertragungsversuche wurden ebenfalls zur Vermehrung des unbekannten Erregers in krautigen Testpflanzen verwendet. Dazu waren folgende Indikatorpflanzen anzuziehen:

Chenopodium quinoa (Willd.)

Chenopodium amaranticolor (Coste & Reyn)

Lycopersicon esculentum (Mill.) 'Peto'

Nicotiana benthamiana (Domin)

Nicotiana clevelandii (A.Gray)

Nicotiana glauca (Grah.)

Nicotiana tabacum var. 'Samsun' (L.)

Nicotiana tabacum var. 'Xanthii' (L.)

Nicotiana rustica (L.)

Zur Keimung wurde das Saatgut in Einheitserde 0 (Fa. Gramoflor) ausgesät, abgedeckt und bei 20-22 °C kultiviert. Nach dem Auflaufen wurden die Sämlinge in Einzeltöpfe mit einem Gemisch aus abgesiebten Torf aus Eigenherstellung und Einheitserde P (Fa. Gramoflor) pikiert und bei 18-20 °C kultiviert.

2.1.3 Virusisolate

Die für die Untersuchungen verwendeten Tobamovirusisolate sind unter Angabe der Bezeichnung, der Wirtspflanze und den Lagerungsbedingungen in Tab. 2.2 aufgeführt. Die Herkünfte der Isolate sind der Fußnote zu entnehmen.

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Virusisolate unter Angabe der Isolatbezeichnung, der Wirtspflanze und den Lagerungsbedingungen

Virus	Bezeichnung	Wirtspflanze	Lagerung
<i>Tomato Mosaic Virus</i> (ToMV)	E 317 ¹	<i>Nicotiana tabacum</i>	-20 °C
ToMV	05/11/1988 ²	<i>Lycopersicon esulentum</i>	CaCl ₂ -getrocknet
ToMV	13/08/1989 ³	<i>Chenopodium quinoa</i>	CaCl ₂ -getrocknet
ToMV	E 151 ⁴	<i>Quercus robur</i> (L.)	-20 °C
<i>Tobacco Mosaic Virus</i> (TMV)	E 152 ⁵	<i>Quercus robur</i> (L.)	-20 °C

2.1.4 Bakterienstämme

Für die Klonierung von PCR-Produkten und von cDNA [synthetisiert aus Doppelstrang-RNA (dsRNA)] wurden zur Transformation chemisch kompetente Zellen der *Escherichia coli* (*E. coli*) -Stämme DH 5α, XL1 Blue (MRF) und JM 109 (Fa. Promega) verwendet.

2.1.5 Plasmide

Zur Ligation sämtlicher PCR-Produkte wurde der T-Klonierungsvektor pGEM®-T Easy der Fa. Promega eingesetzt. Für die 'Blunt End'-Klonierung von cDNA wurde der Klonierungsvektor pEZSeq™ der Fa. Lucigen™ Corporation verwendet.

¹ Institut für Pflanzenkrankheiten der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn

^{2, 3} Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Institut für Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin der Humboldt-Universität zu Berlin

^{4, 5} Standort Nordrhein-Westfalen, FA Arnsberg

2.1.6 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Difco (Schweiz), Fermentas (St. Leon-Roth), Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und Sigma-Aldrich (München) bezogen, sofern im Text keine anderen Bezugsquellen vermerkt sind.

Alle Puffer, Lösungen und Nährmedien wurden mit deionisiertem Wasser (ddH_2O) aus der Ionenaustauscheranlage der Fa. SG bzw. mit Reinstwasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli}}$) aus der Milli-Q-Academic-Anlage der Fa. Millipor angesetzt und anschließend durch Autoklavieren (120°C und 1,2 bar, 20 min) oder durch Filtration ($0,22\ \mu\text{m}$ Porendurchmesser) sterilisiert. Für die Arbeiten mit dsRNA und Gesamt-RNA wurden Puffer, Lösungen und Wasser mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht gerührt und autoklaviert. Nicht autoklavierbare Chemikalien wurden den Puffern und Lösungen nach dem Autoklavieren zugesetzt bzw. mit autoklaviertem DEPC-Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$) angesetzt.

2.1.7 Polyklonale Antikörper

Für den Nachweis von Tobamoviren mit Hilfe des 'Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay' (ELISA), des Agargeldoppeldiffusionstests sowie der 'Imunocapture-Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction' (IC-RT-PCR) wurden nachstehende Antiseren mit polyklonalen Antikörpern der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) verwendet.

<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	Immunglobulin G (IgG) (AS-0190)
(CGMMV):	Immunglobulin G – 2 Aminopurin (IgG-Ap) (2/1990)
<i>Odontoglossum ringspot virus</i> (ORSV):	IgG (AS-0187) IgG-Ap (AS-0187)
<i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV):	IgG (AS-0018) IgG-Ap (AS-0018)
<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV):	IgG (08/1993) IgG-Ap (04/1990)
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV):	IgG (Juni 1999) IgG-Ap (14.06.1996)

2.1.8 Nährmedien

Die Nährmedien zur Anzucht und Vermehrung von *E.coli*-Bakterienstämmen wurden nach SAMBROOK et al. (1989) hergestellt.

Die nachfolgenden Angaben beziehen sich auf jeweils einen Liter Nährmedium:

LB-Medium (Luria-Bertani):	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7,0
LB-Agar:	LB-Medium mit 15 g Agar
LB-AIX-Agar:	LB-Agar mit 50 mg Ampicillin, 30 mg IPTG, 40 mg X-Gal
SOB-Medium:	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,58 g NaCl, 0,18 g KCl, pH 7,5 mit 10 mM MgSO ₂ x 7 H ₂ O und 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O
SOC-Medium:	SOB-Medium mit 20 mM Glukose

Temperaturempfindliche Zusätze wie Ampicillin (Amp 50 mg/ml H₂O), Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG 23,83 mg/ml H₂O) 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal, 20 mg/ml Dimethylformamid) und Glukose wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt.

2.1.9 Oligonukleotide

Die Ableitung sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) wurde mit Hilfe des Primer- Design-Pogrammes Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research) vorgenommen. Die Synthese der Primer erfolgte bei der Fa. Carl Roth (Karlsruhe). Für die jeweiligen PCR-Reaktionen wurden die in Tab. 2.3 mit Angaben zur Bezeichnung, Sequenz und Lage aufgeführten Primer eingesetzt. Dabei wurden die für verschiedene bereits bekannte Viren und Vektoren spezifischen Primer (Nr.: 1-13) nach Literaturangaben synthetisiert. Die Sequenzen der Primer Nr.: 14-19 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung von eichenspezifischer dsRNA erhalten.

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Primer unter Angabe der jeweiligen Kurzbezeichnung, Sequenz, Lage im Genom und Literaturreferenz (sofern nicht selbst abgeleitet)

**B=C,G,T; N=A,T,C,G; R=A,G; *S=G,C; Y=C,T; Pos.=Position; HPG=Hüllproteingen; TPG= Transport proteingen; NKR=nicht kodierende Region; MCS=Multiple Cloning Site

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Lage
1	Tob-Uni1	ATTTAAGTGGASGGAAA V CACT*	HPG, Pos. 6283-6260 (LETSCHERT et al., 2002)
2	Tob-Uni2	GTYGTTGATGAGTTCRTGGA*	HPG, Pos. 5479-5498 (LETSCHERT et al., 2002)
3	TMV-1	GACCTGACAAAAATGGAGAAGATCT	TPG, Pos. 4948-4972 (JACOBI et al., 1998)
4	TMV-2	GAAAGCGGACAGAAACCCGCTG	TPG, Pos. 5348-5369 (JACOBI et al., 1998)
5	ToMV-5	CTCCATCGTTCACACTCGTTACT	TPG, Pos. 5436-5458 (JACOBI et al., 1998)

6	ToMV-6	GATCTGTCAAAGTCTGAGAACTTC	TPG, Pos. 4951-4976 (JACOBI et al., 1998)
7	M13 for	GTAAAACGACGGCCAGT	MCS pGEM®-T Easy, pEZ Seq™
8	M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	MCS pGEM®-T Easy, pEZ Seq™
9	261R P	TGTTAGGTCATCAGTGAAT	RNA 1, pos. 94-98 (MIELKE, 2004)
10	717 FP	CCTTTACACGCTACAATCTGA	RNA 1, Pos. 758-778 (MIELKE, 2004)
11	RW 1	GTC GGA AAG ATT ACG TAA AAG G	3'NKR, RNA 2 (WERNER et al., 1997)
12	RW 2	TGG CGA CCG TGT AAC GGC	3'NKR, RNA 2 (WERNER et al., 1997)
13	DOP-Primer	CCGACTCGAG NNNNNN ATGTGG *	ROCHE (1999)
14	Oak Cryp 1 for	CTCATGTTTCATCGAGTCCGTAG	Klon 13, Pos. 80-101
15	Oak Cryp 1 rev	ACAATAAGCTCGGTACGCTTTG	Klon 13, Pos. 712-733
16	Oak Cryp 2 for	TCACATTGGTCAGGATCCAAC	Klon 13, Pos. 690-710
17	Oak Cryp 2 rev	GTCTTAGCTGGATTGAGATACC	Klon 12, Pos. 92-114
18	Oak Cryp 3 for	AACGGGCGTTACTTATCGAG	Klon 13, Pos. 105-125
19	Oak Cryp 3 rev	TGGATCCTGACCAATGTGAA	Klon 13, Pos. 587-607
20	Bgl-Eco-RH	AGATCTGAATTC NNNNNN *	
21	Bgl-Eco-RH 2	AGATCTGAATTC NNNNNN CC *	

2.2 Methoden

Modifikationen etablierter Methoden werden in allen Protokollen fettgedruckt hervorgehoben.

2.2.1 Biotest und Übertragungswege

2.2.1.1 Mechanische Übertragung auf krautige Indikatorpflanzen

Virusempfindliche, krautige Testpflanzen wurden im Biotest zum Nachweis der Pathogenität des unbekannten Erregers in Stieleichen eingesetzt (Kap. 2.1.2). Aufgrund der niedrigen Virustiter in holzigen Wirten dient die Übertragung auf krautige Testpflanzen ebenso der Vermehrung phytopathogener Viren (BÜTTNER et al., 1996). Für die Versuche zur mechanischen Übertragung des Erregers aus Stieleichen, welche sich an Arbeiten von FULTON (1966) und FÜHRLING (1994) orientierten, wurde als Grundpuffer ein Natriumphosphatpuffer verwendet. Diesem wurden verschiedene Zusätze beigelegt:

Grundpuffer: 0,1 M Natriumphosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$); pH 7,0

Varianten: 1) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M); 1 % (w/v) Na_2SO_3
 2) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M); EDTA (10 mM)
 3) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M); 0,1 % (w/v) Na-DIECA
 4) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M); 1,5 % (v/v) Bentonitsuspension (pH 7,4)
 5) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (0,1 M); 1,5 % (v/v) Bentonitsuspension (pH 7,4); 2 % (w/v) Nicotin

Für die Inokulation mit Pflanzenpresssaft wurde etwa 0,1 g Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörst und in 1 ml Inokulationspuffer gelöst. Als Schleifmittel wurde eine Spatelspitze Celite zugefügt. Die Inokulation der Testpflanzen erfolgte im 4-5 Blattstadium der Indikatorpflanzen. Kontrollpflanzen wurden nur mit Puffer und Celite inokuliert. Bei der "Trockeninokulation" waren ganze Blätter oder Pflanzenmaterial erkrankter Stieleichen, das in flüssigem Stickstoff pulverisiert worden war, ohne Zusatz von Puffer auf die Blätter der Indikatorpflanzen abzureiben.

Nach der Inokulation wurden die Testpflanzen bei 20 °C für drei bis vier Wochen im Gewächshaus kultiviert.

2.2.1.2 Überprüfung der Bodenübertragbarkeit durch das Fangpflanzenverfahren

Zur Überprüfung der Bodenübertragbarkeit des Agens wurden aus dem Wurzelraum erkrankter Stieleichen am Standort B 1 Bodenproben entnommen und in Töpfe mit einem Durchmesser von 10 cm überführt. In diese Erde wurden Sämlinge der Testpflanzen *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana clevelandii* und *Nicotiana glauca* pikiert und für vier Wochen bei 20 °C im Gewächshaus inkubiert.

2.2.1.3 Mechanische Übertragung auf Eichensämlinge

Zur Erfüllung der Koch'schen Postulate ist eine Vermehrung der potenziellen Erreger aus Stieleichen in krautigen Indikatorpflanzen und die anschließende Rückübertragung auf Stieleichen notwendig. Dazu waren aufgereinigte Virussuspensionen aus krautigen Testpflanzen durch mechanische Inokulation unter Verwendung verschiedener Pufferzusätze (Kap. 2.2.1.1) auf symptomfreie, acht Monate alte Eichensämlinge zu übertragen. Darüber hinaus sind im August 2002 Übertragungsversuche mittels 'Stem Slashing' durchgeführt worden. Dazu wurde ein steriles Skalpell in die aufkonzentrierte Virussuspension getaucht und anschließend der verholzte Stengelabschnitt etwa 15-20 cm großer Eichensämlinge dachziegelförmig eingeritzt. Die behandelten Eichensämlinge wurden im Freiland kultiviert und im Folienzelt frostfrei überwintert.

2.2.1.4 Untersuchungen zur Saatgutübertragbarkeit

Im Dezember 2001 wurde am Standort Berlin-Spandau, RFö Hakenfelde (B 3) Saatgut unter erkrankten (E 338-E 341) und symptomlosen (E 342, E 343) Stieleichen gesammelt. Die Eicheln wurden in ein Torf-Kultursubstrat : Sand (1:1)- Gemisch ausgesät und zum Schutz vor Pilzkrankheiten mit Previcur® N (Fa. Bayer Cropscience) angegossen. Die Anzucht der Sämlinge erfolgte frostfrei im Folienzelt. Die Eichensämlinge der Probe E 342 dienten später als symptomfreies Testmaterial für die Inokulationen mit Pflanzenpresssaft und zur künstlichen Infektion durch das 'Stem Slashing' (Kap. 2.2.1.3).

Die Ergebnisse der Übertragungsversuche mit den krautigen Testpflanzen (Kap. 2.2.1.1, Kap. 2.2.1.2) wurden über einen Zeitraum von einem Monat dreimal pro Woche durch eine visuelle Kontrolle der Pflanzen überprüft. Die Bonitur der Symptome an den Eichensämlingen (Kap. 2.2.1.3, Kap. 2.2.1.4) erfolgte in den Jahren 2002-2004 von Mai bis Oktober einmal im Monat. Blattmaterial mit virusverdächtigen Symptomen wurde geerntet, transmissionselektronenmikroskopisch untersucht (Kap. 2.2.4) und bei -20 °C bzw. -80 °C gelagert.

2.2.2 Anreicherung putativer viraler Nukleokapside

Für den Versuch des Nachweises möglicher Viren in Stieleichen wurde eine Nukleokapsidaufreinigung modifiziert nach KELLMANN et al. (2001) durchgeführt. Um Aussagen über eine mögliche Lokalisierung des putativen Virus treffen zu können, wurden 30 g Rindengewebe symptomtragender Stieleichen und 50 g Blätter einer symptomfreien Stieleiche eingesetzt. Puffer, in denen Sedimente wieder gelöst wurden, werden in diesem und allen weiteren Protokollen als Resuspendierungspuffer bezeichnet. Alle Arbeitsschritte waren auf Eis oder bei 4 °C durchzuführen.

Das **Pflanzenmaterial** wurde in flüssigem Stickstoff zerkleinert, mit 3 ml Extraktionspuffer je 1 g Pflanzenmaterial versetzt und bei 4 °C im 'Warring Blendor' homogenisiert. Zur Abtrennung unlöslicher Pflanzenbestandteile wurde der Pflanzenextrakt durch ein steriles Baumwolltuch gepresst und **10 min bei 8.000 rpm**, 4 °C sedimentiert (GR 2022, Fa. Jouan). Nachfolgend wurden die Überstände für **45 min bei 28.000 rpm** ultrazentrifugiert (Beckman Coulter Optima™ Le 80K Ultrazentrifuge, Rotor SW 28), die Sedimente in 4 ml Resuspendierungspuffer 1 aufgenommen und mit einem Glashandhomogenisator gelöst. Die Suspension wurde mit Resuspendierungspuffer 1 auf 40 ml aufgefüllt, für 1 h bei 4°C gerührt und 10 min bei **8.000 rpm**, 4 °C zentrifugiert (GR 2022, Fa. Jouan). Anschließend wurde der Überstand erneut in Ultrazentrifugenröhrchen überführt, mit 10 ml 30 %iger Saccharoselösung unterschichtet und **1 h 20 min bei 31.000 rpm** ultrazentrifugiert (Beckman Coulter Optima™ Le 80K Ultrazentrifuge,

Rotor Ti 70). Das Lösen der Sedimente erfolgte mit dem Glashandhomogenisator in 700 µl einer 10 mM Na₂SO₃-Lösung. 20 µl Suspension wurden für eine SDS-PAGE abgenommen und bei 4 °C aufbewahrt. Der Rest wurde mit Cs₂SO₄ in einer Konzentration von 0,075 g/ml Suspension versetzt und gut durchmischt. Zur Ultrazentrifugation wurde das Gemisch vorsichtig auf 1,3 ml Cäsiumsulfatlösung pipettiert und **18 h bei 40.000 rpm** sedimentiert (Beckman Coulter Optima™ Le 80K Ultrazentrifuge, Rotor SW 60 Ti). Nach der Zentrifugation zeigten sich **im Tageslicht absorbierende** Zonen, die voneinander getrennt mit der Pipette abgesaugt, in Resuspendierungspuffer 2 aufgenommen und für 2 h bei 26.000 rpm ultrazentrifugiert wurden (Beckman Coulter Optima™ Le 80K Ultrazentrifuge, Rotor SW 60 Ti). Die Sedimente wurden in 30 µl Resuspendierungspuffer 2 aufgenommen und **über Nacht bei 4 °C gelöst**. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt für **10 min bei 8.000 rpm**, 4 °C (Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F 241,5) wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert.

Puffer und Lösungen:

Alle Puffer und Lösungen wurden in H₂O_{DEPC} angesetzt. Puffer und Lösungen mit nicht autoklavierbaren Zusätzen wurden vor dem Gebrauch steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Extraktionspuffer: Tris-HCl (10 mM, pH 8,0); 1 % (w/v) L-Cystein; EDTA (10 mM); Na₂SO₃ (10 mM); 2 % (w/v) PVP

Resuspendierungspuffer 1: Tris-HCl (10 mM, pH 7,9); EDTA (10 mM); Na₂SO₃ (10 mM); Glycin (10 mM); 1 % (v/v) Triton-X-100; 1 % (w/v) L-Cystein

Resuspendierungspuffer 2: Tris-HCl (10 mM, pH 7,5)

Cäsiumsulfatlösung: 1,12 g/ml Cs₂SO₄ in Na₂SO₃ (10 mM)

Die angereicherten Nukleokapside wurden elektronenoptisch untersucht (Kap. 2.2.4), in einer 'SDS-PAGE' analysiert (Kap. 2.2.5.3) und mit Hilfe der Zweitstrangsynthese kloniert bzw. in die RT-PCR mit den dsRNA spezifischen Oak Cryp-Primern eingesetzt (Kap. 2.2.9.2 und Kap. 2.2.7.3).

2.2.3 Isolierung von putativen Viruspartikeln aus Pflanzenmaterial

2.2.3.1 Isolierung von Viruspartikeln aus Gehölzen

Für den Versuch der Isolierung von Viruspartikeln aus Eichenblattmaterial wurden verschiedene Methoden modifiziert angewendet, die bereits für Gehölze und bekannte Viren etabliert worden sind. Überstände und aufgereinigte Proben sind im Anschluss elektronenoptisch untersucht (Kap. 2.2.4) und auf krautige Testpflanzen übertragen worden (Kap. 2.2.1.1). Für Proben einzelner Pflanzen, von denen nicht genügend Blattmaterial für eine Aufreinigung zur Verfügung stand, wurden Sammelproben desselben Standortes oder Blätter mit gleichen Symptomen eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden Stieleichenblätter ohne Symptome verwendet. Proben die zur Anreicherung von Viruspartikeln eingesetzt wurden, waren bei -20 °C gelagert (E 148, E

151-E 153, Baum A B3, E 552, E 619, E 1993, E 1997) oder wurden frisch geerntet (E 533, E 534).

Aufreinigung von Viruspartikeln aus Gehölzen modifiziert nach HENTSCH (1998)

Zur Abtrennung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, insbesondere von Tanninen, wurde das Eichenblatthomogenat zunächst mit einer wässrigen Bentonitsuspension vorgeklärt.

Herstellung einer wässrigen Bentonitsuspension nach HENTSCH (1998):

50 g Bentonit wurden in 1000 ml Puffer und 2,46 g MgSO_4 (10 mM) unter kräftigem Rühren ausgeschwemmt. Die groben Bestandteile wurden 2 min bei 2000 rpm sedimentiert (Hettich Universal 16 R, Ausschwingrotor 1624) und verworfen. Nach Zentrifugieren des Überstandes für 16 min bei 16.000 rpm, Raumtemperatur (RT) (GR 2022, Fa. Jouan) wurde das Sediment in 500 ml Puffer aufgenommen, wiederholt niedrig- und hochtourig zentrifugiert und anschließend in 250 ml Puffer gelöst, autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Puffer: Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 -Puffer (10 mM, pH 7,4)

Vorklärung:

Zur Extraktion des Blattmaterials wurden in Abweichung vom Standardprotokoll zwei Puffer mit unterschiedlicher Ionenkonzentration eingesetzt. 50 g Eichenblätter mit virusverdächtigen Symptomen wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert, in einer Duranflasche mit 200 ml Extraktionspuffer durch Rühren oder im Mixer homogenisiert. Die Abtrennung der Proteine erfolgte durch den Zusatz von 3 ml wässriger Bentonitsuspension (pH 7,4) und kräftiges Schütteln (TH 25, Edmund Bühler swip). Anschließend wurde das Homogenat durch zwei Lagen autoklaviertes Baumwolltuch gepresst und 15 min bei 4000 rpm, 4 °C zentrifugiert (Hettich Universal 16 R, Ausschwingrotor 1624). 1 ml des Überstandes wurde für die Inokulation und Transmissionselektronenmikroskopie abgenommen. Der Rest wurde durch Watte filtriert.

PEG-Fällung:

Die Fällung der Viruspartikeln erfolgte durch den Zusatz von 10 ml PEG-Lösung je 40 ml Filtrat und **12-15 h Rühren bei 4 °C**. Nach 15 min Zentrifugieren bei 4000 rpm, 4 °C (Hettich Universal 16 R, Ausschwingrotor 1624) wurde das Sediment in 40 ml Resuspendierungspuffer 1 gelöst und wiederholt für 15 min bei 4000 rpm, 4 °C zentrifugiert (Hettich Universal 16 R, Ausschwingrotor 1624).

differentielle Zentrifugation:

Der Überstand wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 h bei 28.000 rpm sedimentiert (Beckman Coulter Optima™ Le 80 K Ultrazentrifuge, Rotor SW 28). 1 ml des Überstandes wurde zur Inokulation und Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop abgenommen.

Das Sediment wurde in Resuspendierungspuffer (1:5 zum Ausgangsvolumen) aufgenommen und für 10 min bei 12.000 rpm, 4 °C zentrifugiert (GR 2022, Fa. Jouan). Zur Konzentrierung der Viruspartikeln wurde der Überstand für 1,5 h bei 56.000 rpm sedimentiert (Beckman Coulter Optima™ Le 80 K Ultrazentrifuge, Rotor Ti 70). Dieser Ultrazentrifugationsschritt wurde wiederholt, nachdem das Sediment in 2 ml Resuspendierungspuffer gelöst und für 10 min bei 12.000 rpm, 4 °C zentrifugiert worden war (Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F241,5). 1 ml des Überstandes wurde anschließend zur Inokulation und Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop abgenommen, das Sediment in 500 µl Resuspendierungspuffer 2 gelöst und bei 4 °C gelagert.

Puffer:

Extraktionspuffer 1: Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 -Puffer (20 mM, pH 7,0); Na_2SO_3 (50 mM)

Extraktionspuffer 2: Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 -Puffer (100 mM, pH 7,0); Na_2SO_3 (20 mM)

PEG-Lösung: PEG (40 %); NaCl (1 M)

Resuspendierungspuffer 1: Tris-HCl (0,01 M, pH 7,5)

Resuspendierungspuffer 2: Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 -Puffer (10 mM); pH 7,0

Schnellaufreinigung von Viruspartikeln in Anlehnung an REBENSTORF (2002)

Für die Aufreinigung von isometrischen Viruspartikeln wurde eine Extraktionsmethode modifiziert nach REBENSTORF (2002) verwendet, die für die Isolierung von CLRV-Partikeln etabliert worden war.

100 g Stieleichenblätter mit chlorotischen Ringflecken wurden in flüssigem Stickstoff zerkleinert, im 'Warring Blendor' bei 4 °C in 300 ml Extraktionspuffer homogenisiert und zur Abtrennung grober Pflanzenbestandteile durch zwei Lagen autoklaviertes Baumwolltuch gepresst. Zur Fällung der Proteine wurde der Pflanzenpresssaft mit $\frac{1}{4}$ **Volumen (Vol.) Chloroform** angereichert und 30 min bei RT gerührt. Die Abtrennung unlöslicher Bestandteile erfolgte durch 10 min Zentrifugieren bei 5000 rpm, 4 °C (GR 2022, Fa. Jouan). Um die Viruspartikeln aufzureinigen, wurde der Überstand anschließend auf 10 ml eines 40 %igen Zuckerkissens aufgebracht und **1 h bei 60.000 rpm** ultrazentrifugiert (Beckman Coulter Optima™ Le 80K Ultrazentrifuge, Rotor Type 70 Ti). Das Sediment wurde in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert, 10 min bei 5000 rpm, 4 °C zentrifugiert (Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F241,5) und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Puffer:

Extraktionspuffer: Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 -Puffer (50 mM), 2,25 g/l Na-DIECA; pH 7,0

Zuckerkissen: 40 % Saccharose in dH_2O

Aufreinigung von Viruspartikeln nach DIJKSTRA et al. (1996)

Für die Aufreinigung von fadenförmigen Viruspartikeln wurde die Methode von DIJKSTRA et al. (1996) angewendet. Dazu wurden 50-70 g Stieleichenblätter mit virusverdächtigen Symptomen in flüssigem Stickstoff pulverisiert, mit 3 ml Puffer/g Blattmaterial extrahiert und 1 h auf Eis gerührt. Der Pflanzenrohextrakt wurde durch zwei Lagen autoklaviertes Baumwolltuch gepresst und für 30 min bei 8000 rpm, 4 °C zentrifugiert (GR 2022, Fa. Jouan). Zum Membranaufschluss wurde der Überstand mit Triton X 100 (Endkonzentration 1 % v/v) versetzt, 1 h auf Eis gerührt und 15 min bei 8000 rpm, 4 °C zentrifugiert (GR 2022, Fa. Jouan). Durch Ultrazentrifugation auf einem 20 %igen Zuckerkissen (3 h, 90.000 rpm, Beckman Coulter Optima™ Le 80K Ultrazentrifuge, Rotor Type 70 Ti) wurden die Viruspartikeln anschließend aufkonzentriert. Das Sediment wurde über Nacht durch Schwenken (Belly Dancer, Fa. Stovall) bei 4 °C in 500 µl Resuspendierungspuffer gelöst und bei 4 °C gelagert.

Puffer:

Extraktionspuffer: KH_2PO_4 (0,05 M); EDTA (0,01 M), 1 % (w/v) Na_2SO_3 , 5 % (v/v) Ethanol; pH 7,6

Resuspendierungspuffer: KH_2PO_4 (0,05 M); EDTA (0,01 M), 1 % (w/v) Na_2SO_3 , pH 7,6)

2.2.3.2 Isolierung von Viruspartikeln aus krautigen Pflanzen

Die Isolierung von Tobamoviruspartikeln aus krautigen Indikatorpflanzen erfolgte verkürzt nach der Methode von GOODING & HEBERT (1967). Dazu wurde 10-20 g frisches Blattmaterial infizierter *Chenopodium quinoa*-Pflanzen im Extraktionspuffer (1 ml Puffer/1 g Pflanzenmaterial) homogenisiert. Zum Abtrennen grober Pflanzenbestandteile wurde das Homogenat durch zwei Lagen autoklaviertes Baumwolltuch gepresst. Das Aufbrechen der Proteine erfolgte durch Zugabe von 8 ml n-Butanol je 100 ml Pflanzenextrakt und 15 min Rühren bei RT. Nach 30 min Zentrifugieren bei 10.000 rpm, 4 °C (GR 2022, Jouan) wurde der Überstand mit 4 g PEG und 0,4 g NaCl je 100 ml versetzt und unter Rühren bei 4 °C inkubiert. Die gefällten Viruspartikeln wurden 15 min bei 10.000 rpm, 4 °C (GR 2022, Jouan) sedimentiert und anschließend in 2 ml Resuspendierungspuffer je 100 ml Pflanzenextrakt aufgenommen. Nach Reinigung des gelösten Sediments durch wiederholtes Zentrifugieren (5 min, 10.000 rpm, 4 °C; Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F241,5) wurde die Virussuspension bei 4 °C gelagert.

Puffer:

Extraktionspuffer: Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 -Puffer (0,5 M), 1 % (w/v) β -Mercaptoethanol oder 0,1 % (v/v); Thioglycolsäure; pH 7,2

Resuspendierungspuffer: Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 -Puffer (0,01 M; pH 7,2)

Um nach der Charakterisierung des unbekannten Erregers spezifische serologische und molekularbiologische Untersuchungen durchführen zu können, wurden alle aufgereinigten Pflanzenextrakte bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Aufgereinigte Virusisolate und Pflanzenmaterial mit virusverdächtigen Blattsymptomen wurden in Puffer homogenisiert und im Transmissionselektronenmikroskop ZEISS EM 10 C auf Viruspartikeln untersucht. Für die Probenpräparation wurden Kupfernetze (300-400 mesh, Fa. Plano) verwendet, die mit einem dünnen Pioloformfilm beschichtet und zur Stabilität mit Kohle bedampft worden waren. Die Kupfernetze wurden für 10-60 min auf einem Tropfen Virussuspension inkubiert, mit Filterpapier getrocknet, anschließend 3 x in ddH₂O-Tropfen für jeweils 10 sec gewaschen und erneut getrocknet. Die Negativkontrastierung erfolgte mit Uranylacetat (2 %, w:v) für 10-30 sec. Die Restflüssigkeit wurde mit einem Filterpapier abgesaugt.

Puffer:

Homogenisierungspuffer: Na₂PO₄ / NaH₂PO₄-Puffer (0,01 M; pH 7,4)

2.2.5 Serologische Methoden

2.2.5.1 DAS-ELISA ('Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked-Immunosorbent Assay')

Eichenblattproben, in denen sich elektronenmikroskopisch stäbchenförmige Viruspartikeln detektieren ließen, wurden im DAS-ELISA mit verschiedenen Antikörpern (Kap. 2.1.7) gegen Tobamo-Viren getestet. Die Durchführung erfolgte nach CLARK & ADAMS (1977).

Hierzu wurden die Kavernen einer ELISA-Platte mit je 200 µl Antikörperlösung [IgG, verdünnt in Beschichtungspuffer im Verhältnis 1:1000 bzw. 1:500 (v/v)] beschichtet. Die Bindung der Antikörper an die Kavernenwandungen erfolgte durch 4 h Inkubation bei 37 °C. Überschüssige Antikörper wurden durch drei Waschschriffe (3 min mit Waschpuffer) entfernt, die auch jedem weiteren Inkubationsschritt folgten. Vor dem Probenauftrag wurde das Pflanzenmaterial in 20 µl Probenpuffer je mg Feuchtgewicht homogenisiert und zur Abtrennung von grobem Pflanzenmaterial 1 min bei 12.000 rpm, 4 °C zentrifugiert (Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F241,5). Zur Bindung der Antigene wurden je 200 µl Pflanzenhomogenat pro Kaverne über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Anlagerung des spezifischen enzymkonjugierten Antikörpers [IgG-Ap, verdünnt in Konjugatpuffer 1:1000 bzw. 1:500 (v/v)] erfolgte anschließend für 4 h bei 37 °C. Detektiert wurde mit 200 µl Substratlösung (0,6-1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat frisch in Substratpuffer gelöst). Die Extinktionsmessung der Farbreaktion erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader (Fa. TECAN). Als positiv bewertet wurden Proben, deren Werte über dem zweifachen der Negativkontrolle (gesundes Pflanzenmaterial) lagen.

Puffer und Reagenzien:

10 x PBS- Puffer (1l):	80 g NaCl; 2 g KH ₂ PO ₄ ; 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ; 2 g KCl; pH 7,4
Probenpuffer:	1 x PBS; 0,1 % (v/v) Tween 20; 2 % (w/v) PVP (Mr 40.000)
Beschichtungspuffer (1l):	1,59 g Na ₂ CO ₃ ; 2,93 g NaHCO ₃ ; pH 9,6
Konjugatpuffer:	1 x PBS; 0,2 % (w/v) Albumin
Waschpuffer:	1 x PBS mit 1 % (v/v) Tween 20
Substratpuffer (1l):	97 ml Diethanolamin ad 1l dH ₂ O; pH-Wert mit HCl auf 9,8 einstellen; 1 mg p-Nitrophenylphosphat pro ml Substratpuffer

2.2.5.2 Agargeldoppeldiffusionstest (Ouchterlony-Test)

Für den serologischen Vergleich der Tobamovirusisolate wurde ein Agargeldoppeldiffusionstest nach OUCHERTLONY (1968) in Plastikpetrischalen durchgeführt. Die Durchmesser der 1 cm voneinander entfernten Vertiefungen im Agar betrugen 4 mm. Auf einer Petrischale wurden vier Tests mit jeweils unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen [1:1000, 1:500, 1:100, 1:10, v:v in Konjugatpuffer für ELISA (Kap. 2.2.5.1)] und sechs Pflanzenproben durchgeführt. Als Antigene wurden aufgereinigte Virusisolate (Kap.2.1.3) aus krautigen Testpflanzen eingesetzt.

Zusammensetzung des Agars: Bacto-Agar (0,6 %) in KH₂PO₄-Puffer (0,01 M); Ampicillin (1:1000, v:v) aus Stammlösung 50 mg/ml

Antikörper: ToMV IgG (Kap. 2.1.7)

2.2.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung und Färbung von Proteinen

Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die in der Nukleokapsidaufreinigung angereicherten Proteine (Kap. 2.2.2) wurden mit Hilfe der SDS-PAGE in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini Protean 3 Cells, Fa. Bio-Rad) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels betrug 12,5 %, diejenige des Sammelgels 4 %. Die Zusammensetzung der Gellösung ist in Tab. 2.4 dargestellt.

Tab.2. 4: Zusammensetzung der Gellösung (Volumina für zwei Gele)

* 25 % (Acrylamid/ Bisacrylamid: 37,5:1; Fa. Roth)

	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 4 %
Acrylamidlösung *	5 ml	0,8 ml
Trenngelpuffer (4 x)	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer (4 x)	-	1,25 ml
Probenpuffer	-	10 µl
dH ₂ O	2,5 ml	2,9 ml
APS	80 µl	30 µl
TEMED	8 µl	3 µl

10 µl angereicherter Nukleokapside wurden mit 10 µl 2 x Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Als Größenstandard diente ein ungefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker der Fa. Fermentas. Dieser wurde 1:5 (v:v) im 2 x Probenpuffer verdünnt und in derselben Weise wie die Proben vorbehandelt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 125 Volt für etwa 1,5 h in Elektrophoresepuffer. Die Proteinbanden wurden anschließend mit Hilfe der Silberfärbung visualisiert.

Puffer und Lösungen:

4 x Trenngelpuffer: Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8); 0,4 % (w/v) SDS

4 x Sammelgelpuffer: Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8); 0,4 % (w/v) SDS

Elektrophoresepuffer: Tris (50 mM); Glycin (380 mM); 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,3

2 x Probenpuffer: Tris-HCl (20 mM, pH 8,0); EDTA (2 mM); 2 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 20 % (v/v) Glycerol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

APS: 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat

TEMED: N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin (Roth)

Silberfärbung

Die Färbung der im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine erfolgte durch eine hochempfindliche Silberfärbung, modifiziert nach BLUM (1987).

Nach der gelelektrophoretischen Trennung wurde das Gel für 1 h im Fixierbad geschwenkt und anschließend 2 x 20 min zunächst in Waschlösung 1 und dann 1 min in Waschlösung 2 inkubiert. Zur Neutralisierung wurde das Gel 3 x 20 sec in ddH₂O gewaschen, bevor die Proteine durch 20 min Schwenken (Belly Dancer, Fa. Stovall) in einer 0,2 %igen Silbernitratlösung angefärbt wurden. Nach einem weiteren Waschschrift (2 x 20 sec in ddH₂O) wurden die Proteinbanden durch Inkubation in Entwicklerlösung detektiert und die Reaktion durch 2 x 2 min Waschen in ddH₂O gestoppt. Das Gel wurde abschließend 10 min in Fixierlösung geschwenkt und zur Konservierung 30 min in Waschlösung 3 inkubiert. Die Proteinbanden wurden unter Durchlicht ausgewertet und mit Hilfe der Spiegelreflexkamera Canon EOS 300 dokumentiert.

Lösungen:

Fixierlösung: 50 % (v/v) MetOH; 12 % (v/v) Eisessig; 0,02 % (v/v) Formaldehyd

Waschlösung 1: 30 % (v/v) Ethanol unvergällt

Waschlösung 2 (frisch): 0,02 % (w/v) Na₂S₂O₃ x 5 H₂O

Waschlösung 3: 3 % (v/v) Glycerin in Fixierlösung

Färbelösung (frisch): 0,2 % (w/v) AgNO₃; 0,03 % (v/v) Formaldehyd

Entwicklerlösung (frisch): 6 % w/v Na₂CO₃; 0,02 % (v/v) Formaldehyd; 0,2 % (v/v) Waschlösung 2

2.2.6 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Nukleinsäureextrakte wurden aus Blatt-, Knospen- und Rindenproben von Gehölzen sowie aus Blattproben von krautigen Indikatorpflanzen hergestellt und zum Virusnachweis mittels RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern eingesetzt. Die Bestimmung der Konzentration der isolierten Gesamt-RNA erfolgte durch spektralphotometrische Messungen (Kap. 2.2.6.8). Die Qualität der Gesamt-RNA wurde durch elektrophoretische Trennung im Agarosegel überprüft (Kap. 2.2.6.9). Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von vier verschiedenen Extraktionsverfahren isoliert.

Isolierung von Gesamt-RNA mit Hilfe von Invisorb® Nukleo Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex)

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gehölzen und krautigen Pflanzen mit Invisorb® Nukleo Spin Plant RNA Mini Kit (Fa. Invitex) wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Isolierung von Gesamt-RNA modifiziert nach DELLAPORTA et al. (1983)

0,5 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff (**ohne Quarzsand**) pulverisiert und in vorgekühlte 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Je 0,5 g Pflanzenmaterial wurden 750 µl Extraktionspuffer sowie **400 µl Chloroform und 400 µl Phenol** zugegeben und gut gemischt.

Die Abtrennung unlöslicher Pflanzenbestandteile erfolgte durch 20 min Zentrifugieren bei 15.000 rpm, 4 °C (Beckman-Coulter Microfuge® R Festwinkelrotor F241,5). Zum Aufschluss der Proteine wurde der wässrige Überstand mit 50 µl Natriumdodecylsulfat (SDS, 1/15 Vol.) versetzt, gut gemischt (MS 1 Minishaker, Fa. IKA) und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Das Gemisch wurde mit 250 µl (0,3125 Vol.) Kaliumacetatlösung versetzt, bevor es für 20 min auf Eis inkubiert und nachfolgend für 20 min bei 15.000 rpm, 4 °C zentrifugiert wurde (Beckman-Coulter Microfuge® R Festwinkelrotor F241,5). Die Nukleinsäuren wurden anschließend unter Zugabe von 650 µl (0,65 Vol.) Isopropanol für 30 min bei -20 °C gefällt und für 20 min bei 15.000 rpm, 4 °C sedimentiert (Beckman-Coulter Microfuge® R Festwinkelrotor F241,5). Nach Lösen des Sedimentes in 100 µl 0,1 x TE-Puffer wurden die Nukleinsäuren über Nacht bei -20 °C erneut gefällt (Kap. 2.2.6.7), in 50 µl 0,1 x TE-Puffer aufgenommen und zur Degradation pflanzlicher DNA 1 h bei 37 °C mit 10 U DNase1 verdaut. Die Gesamt-RNA wurde bei -20 °C gelagert.

Puffer und Lösungen:

Extraktionspuffer:	Tris-HCl (100 mM); EDTA (50 mM); NaCl (50 mM); pH 8,0
SDS-Lösung:	20 % (w/v) SDS in H ₂ O
Kaliumacetatlösung:	60 ml Kaliumacetat (5 M); 11,5 ml Essigsäure; 28,5 ml H ₂ O _{DEPC} (die Lösung ist 3 M bezogen auf Kalium und 5 M bezogen auf Acetat)
1 x TE-Puffer:	Tris-HCl (10 mM); EDTA (1 mM); pH 8,0

Isolierung von Gesamt-Nukleinsäuren modifiziert nach BOOM et al. (1990)

Für die Isolierung von Gesamt-Nukleinsäuren, modifiziert nach BOOM et al. (1990), wurden 100 mg Pflanzenmaterial (Rinde, Blätter) in flüssigem Stickstoff pulverisiert und in 1 ml **Extraktionspuffer** aufgenommen. Jeweils 500 µl des Gemisches wurden in ein steriles 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 10 % SDS versetzt und unter zwischenzeitlichem Mischen für 10 min bei 70 °C inkubiert. Der Extrakt wurde für 5 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm, 4 °C zentrifugiert (Beckman-Coulter Microfuge® R Festwinkelrotor F241,5). Je 300 µl des nukleinsäurehaltigen Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und mit 300 µl Natriumiodid-Lösung, 150 µl Ethanol absolut sowie 25 µl Silica-Lösung versetzt. Zur Bindung der Nukleinsäuren an die Silicapartikel wurde das Gemisch für 10 min bei RT inkubiert und zwischendurch vorsichtig gemischt. Die Sedimentation der gebundenen Nukleinsäuren erfolgte durch 10 min Zentrifugieren bei 6000 rpm, 4 °C (Beckman-Coulter Microfuge® R Festwinkelrotor F241,5). Anschließend wurde das Sediment zweimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen, in 200 µl H₂O_{DEPC} resuspendiert und für 4 min auf 70 °C erhitzt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 13.000 rpm, 4 °C (Beckman-Coulter Microfuge® R Festwinkelrotor F241,5) wurde der **nukleinsäurehaltige Überstand** in ein neues Reaktionsgefäß überführt und **mit Chloroform/Phenol extrahiert** (Kap. 2.2.6.6). Die **Fällung der RNA** aus der wässrigen Phase erfolgte **über Nacht bei -20 °C** (Kap. 2.2.6.7). Die Gesamt-RNA wurde anschließend in 30 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Puffer und Lösungen:

Extraktionspuffer:	Guanidinhydrochlorid (6 M); Natriumacetat (0,2 M, pH 5,2); Kaliumacetat (1 M); EDTA (25 mM); 2,5 % PVP
Natriumiodid-Lösung:	Natriumiodid (6 M); Natriumsulfit (0,15 M)
Silica-Lösung:	1 g/ml, pH 2,0; 2 x in H ₂ O _{DEPC} aufschwemmen und 4 h sedimentieren lassen
Waschpuffer:	Tris-HCl (10 mM, pH 7,5); EDTA (0,5 mM); NaCl (50 mM), 50 % Ethanol absolut
SDS-Lösung:	10 % SDS in H ₂ O _{DEPC}

2.2.6.2 Isolierung von doppelsträngiger (ds)-RNA

Für die Isolierung von dsRNA wurde die Methode nach BENTHACK (2001) verwendet, die auf Untersuchungen von MORRIS & DODDS (1979) zurückgeht und für die Isolierung von dsRNA aus Ebereschen modifiziert worden war. DsRNA-Isolierungen erfolgten aus 50-100 g Blattmaterial, 12-15 g Rindengewebe sowie 8-10 g Knospen erkrankter und symptomloser Stieleichen. Studien zum Einfluss des Probenahmezeitpunktes und -standortes, des Ausgangsmaterials, der Lagertemperatur und -dauer, des Pflanzenmaterials sowie des Extraktionsverfahrens auf die

Menge und Qualität der dsRNA sind im Rahmen einer Projektarbeit durchgeführt worden und einem Tagungsbeitrag zu entnehmen (ROTT et al., 2004).

Zur Extraktion wurde das Pflanzenmaterial zunächst in flüssigem Stickstoff pulverisiert, mit Extraktionspuffer versetzt und für 3 min mit einem Ultra Turrax (T 25, Fa. Ika) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat für 30 min bei RT kräftig geschüttelt (TH 25 swip, Fa. Edmund Bühler) und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Sedimentation grober Pflanzenbestandteile erfolgte durch 20 min Zentrifugieren bei 4000 rpm, 4 °C (Hettich Universal 16 R, Ausschwingrotor 1624). Zur spezifischen Bindung der dsRNA wurde der wässrige Überstand mit 0,2 Vol. 96 %igem Ethanol und 2 g CF11-Cellulose (Fa. Sigma) versetzt und 30 min kräftig geschüttelt (TH 25 swip, Fa. Edmund Bühler). Die an die CF11-Cellulose gebundene dsRNA wurde durch 10 min Zentrifugieren bei 4000 rpm, 4 °C (Hettich Universal 16 R, Ausschwingrotor 1624) sedimentiert und 3 x mit 40 ml Waschpuffer gewaschen. Dazu wurde die Lösung 15 min geschüttelt, 10 min bei 4000 rpm, 4 °C zentrifugiert (Hettich Universal 16 R, Ausschwingrotor 1624), der Überstand abgegossen und neuer Waschpuffer zugesetzt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Cellulose in 20 ml Waschpuffer aufgenommen, in eine 20 ml Kunststoffspritze überführt und mit Pressluft getrocknet. Die gebundenen Nukleinsäuren wurden mit 13 ml Elutionspuffer (5+5+3 ml; dazwischen Pressluft) eluiert und unter Zugabe von 0,2 Vol. 96 %igem Ethanol durch 20 min kräftiges Schütteln (TH 25 swip, Fa. Edmund Bühler) erneut an CF11-Cellulose (0,5 g) gebunden. Das Cellulosegemisch wurde sofort in eine 20 ml Kunststoffspritze überführt und durch Pressluft getrocknet. Die dsRNA wurde mit 2 ml Elutionspuffer (1+1 ml; dazwischen Pressluft) eluiert, zur Beseitigung von Celluloseresten für 3 min bei 13.000 rpm, 4 °C zentrifugiert (Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F241,5) und über Nacht bei -20 °C gefällt (Kap. 2.2.6.7). Zur Stabilisierung der dsRNA wurde das Präzipitat vor dem DNase/RNase-Verdau in 140 µl H₂O_{DEPC} resuspendiert und mit 60 µl 1M MgCl₂ (Endkonzentration: 0,3 M) versetzt. Die Degradation von DNA- und ssRNA-Resten erfolgte unter Zugabe von 1 µl RNase A (100 µg/ml) und 1,4 µl DNase (14 U) und 40 min Inkubieren bei 37 °C. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde das Gemisch 2 x mit Phenol/Chloroform und 1 x mit Chloroform extrahiert (Kap. 2.2.6.6). Die dsRNA aus der wässrigen Oberphase wurde durch 12 h Fällung bei -20 °C konzentriert (Kap. 2.2.6.7) und anschließend in 20 µl H₂O_{DEPC} resuspendiert. Zur Berechnung der Konzentration wurde 1 µl der isolierten dsRNA spektralphotometrisch gemessen (Kap. 2.2.6.8). 8-10 µl dsRNA wurden zur Überprüfung des Bandenmusters im Agarosegel aufgetrennt und der Rest von 10 µl bei -80 °C gelagert.

Puffer und Lösungen:

Extraktionspuffer:	10 g (Knospen)	20 g (Rinde)	50 g (Blätter)
2 x STE _{DEPC} -Puffer mit 3 % (w/v) SDS	20 ml	50 ml	100 ml

H ₂ O _{DEPC}	5 ml	10 ml	25 ml
β- Mercaptoethanol	0,4 ml	0,8 ml	2,0 ml
1 % (w/v) PVP unlöslich	0,25 g	0,5 g	1,25 g
Waschpuffer:	1 x STE _{DEPC} , 16 % Ethanol		
Elutionspuffer:	1 x STE _{DEPC}		

Zur Optimierung der dsRNA-Isolierung aus Stieleichen wurden die in Tab. 2.5 aufgeführten Modifikationen der angegebenen Arbeitsschritte mit Blattmaterial erkrankter Stieleichen getestet. Für diese Untersuchungen wurde eine Mischprobe infizierter Stieleichenblätter eingesetzt, die im Juni 2003 entnommen und bei -80 °C gelagert worden war (E 878).

Tab. 2.5: Varianten der dsRNA-Isolierung unter Angabe des Arbeitsschrittes und der Modifikation

Arbeitsschritt	Methode	Puffer
Extraktion des Pflanzenmaterials	- Chloroform/Phenol-Extraktion	- Erhöhung der Extraktionspuffermenge auf das 1,5 fache Volumen - Zugabe von 2 ml Bentonit-suspension (Kap. 2.2.3.1) je 127 ml Extraktionspuffer - Absenkung des pH-Wertes auf 5,5; 6,0; 6,5
Waschen der gebundenen dsRNA	- Waschen im 'Batch-Verfahren' (Zentrifugation der CF11-Cellulose anstatt Filtration des Puffers)	- Absenkung des pH-Wertes auf 6,0
Elution der dsRNA	-Elution im 'Batch-Verfahren'	
Fällung	- -80°C anstatt -20°C	

Hinsichtlich des verwendeten Probenmaterials wurden folgende Einflussfaktoren untersucht:

- 1) Lagertemperatur: Lagerung bei -20 °C; -80 °C
- 2) Lagerdauer: frisch geerntet; bis 12 Monate bei -80 °C gelagert; bis 1,5 Jahre bei -20 °C gelagert
- 3) Aufbereitung: Blätter; in flüssigem Stickstoff zerkleinertes Blattmaterial
- 4) Probenahme: Herbst/Winter (Knospen, Rinde); Frühjahr/Sommer (Blätter)
- 5) Probenherkunft: Forstamtsbereiche in Nord- und Mitteldeutschland (Tab. A1, Anhang 4)
- 6) Probenmenge: 10 g Knospen; 20-25 g Rinde; 50 –100 g Blätter

Um zu prüfen, ob die Lagerungsform und -dauer einen Einfluss auf die Ausbeute an dsRNA hat, wurden von den Standorten B 1-3 (Kap. 2.1.1) im Mai und Juni des Jahres 2003 jeweils vier Proben infizierten und symptomlosen Blattmaterials und im März Rindengewebe sowie Knospen von symptomtragenden Stieleichen entnommen. Die Rinden- und Knospenproben wurden für fünf Tage bei 4 °C aufbewahrt und anschließend bei -80 °C gelagert. Jeweils 50 g gesundes (E 823) und infiziertes Blattmaterial (E 825) wurden in flüssigem Stickstoff zerkleinert und für eine Nacht bei -80 °C gelagert. Die gleiche Menge Blattmaterial symptomtragender (E 886) und symptomloser (E 824) Stieleichen wurde für acht Monate bei -80 °C gelagert. Zum Vergleich wurden Blattproben verwendet, die für sechs (E 551, E 552) bzw. 17 Monate (E 534 a, E 545 a) bei -20 °C gelagert worden waren. Nachfolgend wurden aus jeweils 50 g Blattmaterial sowie 10 g Rinden- und 8 g Knospenmaterial dsRNA nach BENTHACK (2001) isoliert und die Reinheit und Ausbeute sowohl durch Gelelektrophorese (Kap. 2.2.6.9) als auch durch photometrische Messung (Kap. 2.2.6.8) überprüft.

Für Untersuchungen zur Abhängigkeit der dsRNA-Konzentration vom Zeitpunkt der Probenahme wurden Eichenblattproben einmal Ende Mai, dreimal im Juni, Juli und August und zweimal im Oktober am Standort B 1 entnommen und jeweils 50 g in die dsRNA-Isolierung eingesetzt (Tab. A1, Anhang 4).

2.2.6.3 Eluierung von dsRNA und DNA aus Agarosegelen

Eluierung von dsRNA aus Agarosegelen

Für die Klonierung bzw. Amplifizierung von dsRNA aus Stieleichen wurden die spezifischen Banden unter UV-Licht mit einer sterilen Rasierklinge ausgeschnitten und in ein steriles, RNase-freies 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.

Die Isolierung von dsRNA aus Agarosegelen ist mit vier verschiedenen Methoden durchgeführt worden. Methode 1) basiert auf dem Prinzip der Abtrennung der Agarose von den Nukleinsäuren durch Filtration. Mit den Methoden 2) und 4) wurde die dsRNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion vom Agarosegel getrennt. Methode 3) beschreibt eine Kombination zwischen Gelfiltration und Chloroform-Phenol-Extraktion. Alle Proben wurden nach der Reinigung bei -20 °C gefällt (Kap. 2.2.6.7), in 5 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen und im 1 % igen Agarosegel überprüft. Zur cDNA-Synthese wurden 5 µl der aus dem Gel eluierten dsRNA-Probe E 841 eingesetzt.

1) dsRNA-Extraktion aus Agarosegelen durch NucleoSpin® Extrakt Kit:

Die dsRNA-Isolierung aus Agarosegelen unter Verwendung des NucleoSpin® Extrakt Kit erfolgte entsprechend den Herstellerangaben der Fa. Macherey & Nagel.

2) dsRNA-Extraktion aus Agarosegelen durch Chloroform-Phenol-Extraktion:

Das ausgeschnittene Gelstück wurde zunächst unter Zugabe von 300 µl/100 mg Agarose NT-Puffer aus dem NucleoSpin® Extrakt Kit (Fa. Macherey & Nagel) bei 65 °C aufgeschmolzen und zwischendurch gut gemischt (MS 1 Minishaker, Fa. IKA). Danach wurde die dsRNA durch eine Behandlung mit Chloroform und Phenol von der Agarose getrennt (Kap. 2.2.6.6).

3) dsRNA-Extraktion aus Agarosegelen nach BENTHACK (2001):

Die Extraktion von dsRNA aus 1 %iger 'Low Melt'-Agarose wurde nach den Angaben im Protokoll durchgeführt. Dazu wurde das Gelstück unter Verwendung einer 300 mM MgCl₂-Lösung durch 3 mm Whatman-Papier filtriert und anschließend mit Chloroform und Phenol extrahiert (Kap. 2.2.6.6).

4) dsRNA-Extraktion aus Agarosegelen nach SAMBROOK et al. (1989):

Das ausgeschnittene Gelstück wurde mit 5 Vol. Extraktionspuffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) versetzt, 5 min bei 65 °C inkubiert und zwischendurch kräftig gemischt (MS 1 Minishaker, Fa. IKA). Die Trennung der Nukleinsäuren vom Agarosegel erfolgte durch eine Chloroform-Phenol-Extraktion (Kap. 2.2.6.6).

Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Präparative DNA-Gelelektrophoresen wurden in Abhängigkeit von der Gelgröße bei 50-80 V, wie in Kap. 2.2.6.9 beschrieben, durchgeführt. Die gewünschten Fragmente wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und die Agarose unter Verwendung von QuiAquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen), NucleoSpin® Extract Kit (Fa. Macherey & Nagel) oder Just Spin® Gel Extraction Kit (Fa. Genaxxon) nach den beiliegenden Protokollen entfernt. Anschließend wurde die DNA mit 30-50 µl Eluierungspuffer der jeweiligen Hersteller eluiert, über Nacht gefällt (Kap. 2.2.6.7) und in 3-10 µl H₂O_{DEPC} resuspendiert. Die gelösten Nukleinsäuren wurden bei -20 °C gelagert oder sofort in den Vektor pGEM® -T Easy (Fa. Promega) ligiert.

2.2.6.4 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzen

Gesamt-DNA wurde aus jeweils einer Blattprobe *Chenopodium quinoa* (symptomlos) und *Quercus robur* (mit Symptomen) unter Verwendung des NucleoSpin® Plant Kit (Fa. Macherey & Nagel) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die Qualität der DNA-Präparation wurde anschließend im 1 %igen nativen Agarosegel anhand des Bandenmusters überprüft (Kap. 2.2.6.9).

2.2.6.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Schnellisolierung von Plasmid-DNA

Für die Durchführung von Restriktionsanalysen wurde die Plasmid-DNA durch eine Schnellisolierung aus den *E.coli*-Bakterienzellen gereinigt.

Mit einer über Nacht gewachsenen *E. coli*-Einzelkolonie wurden 5 ml LB-Medium (Kap. 2.1.8 + Ampizilin, 50 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (TH 25 swip, Fa. Edmund Bühler, 180 rpm) vermehrt. Die Bakterienzellen von 1,5 ml Flüssigkultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert (30 sec 12.000 rpm, RT; Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F241,5), das Bakteriensediment in 100 µl eisgekühlter Lösung 1 resuspendiert, mit 200 µl frisch zubereiteter Lösung 2 versetzt, fünfmal invertiert und auf Eis inkubiert. Nach Neutralisation durch Zugabe von 150 µl eisgekühlter Lösung 3, mischen (MS 1 Minishaker, Fa. IKA) und 2 min Inkubieren auf Eis, wurden Proteine und chromosomale Bakterien-DNA durch Zentrifugation (5 min bei 12.000 rpm, 4 °C; Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F241,5) sedimentiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und einmal mit Chloroform und Phenol extrahiert (Kap. 2.2.6.6). Die Fällung der Plasmid-DNA aus dem wässrigen Überstand erfolgte mit 2 Vol. EtOH (96 %) für 2 min bei RT. Durch 5 min Zentrifugieren bei 12.000 rpm, 4 °C (Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F241,5) wurde die Plasmid-DNA sedimentiert, einmal mit 70 % EtOH gewaschen und erneut 5 min bei 12.000 rpm, 4 °C zentrifugiert (Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F 241,5). Das Sediment wurde im Vakuum (Speed Vac SC 100, Fa. Savant) getrocknet, in 50 µl TE-Puffer gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

Puffer und Lösungen:

- Lösung 1: Tris-HCl (25 mM); EDTA (10 mM, pH 8,0); Glucose (50 mM)
 Lösung 2: NaOH (0,2 N); SDS (1 %)
 Lösung 3 (100ml): 60 ml Kaliumacetat (5 M); 11,5 ml Eisessig; 28,5 ml ddH₂O

Isolierung von Plasmid-DNA mit NucleoSpin® Plasmid (Fa. Macherey & Nagel)

Wurden Präparationen von einem hohen Reinheitsgrad benötigt, wie beispielsweise für die Sequenzierung, erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Fa. Macherey & Nagel) nach den Herstellerangaben.

2.2.6.6 Chloroform-Phenol-Extraktion von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren von Proteinen und Lipiden zu reinigen, wurden diese mit 1 Vol. Phenol/Chloroform versetzt und gründlich durchmischt. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation (8 min bei 13.000 rpm, 4 °C; Beckman-Coulter Microfuge® R, Fest-winkelrotor F241, 5) voneinander getrennt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit 1 Vol. Phenol/Chloroform extrahiert. Zur Entfernung von Phenolresten wurde die wässrige Phase einmal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert. Die so gereinigten Nukleinsäuren konnten anschließend als Natrium- oder Lithiumchloridsalz mit EtOH aus der wässrigen Phase präzipitiert werden.

2.2.6.7 Nukleinsäurefällung

Gereinigte Nukleinsäuren wurden mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) sowie 2,5 Vol. EtOH (absolut) eiskalt versetzt und über Nacht bei -20 °C oder -80 °C gefällt. Die Fällung von Gesamt-RNA wurde alternativ mit 4 M LiCl durchgeführt.

Im Anschluss an die Fällung wurden die Nukleinsäuren für 40 min bei 13.000 rpm, 4 °C sedimentiert (Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F241, 5). Zum Entfernen der Salze wurden die Präzipitate zweimal mit 70 % EtOH eiskalt gewaschen, je 20 min zentrifugiert (Beckman-Coulter Microfuge® R, Festwinkelrotor F 241,5; 13.000 rpm, 4 °C) und für 5 min unter Vakuum (Speed Vac SC 100, Fa. Savant) getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden in 20 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.6.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren (Gesamt-RNA, dsRNA, Plasmid-DNA) wurde mit Hilfe von vier Spektralphotometern (ND-1000, Fa. Nanodrop; Ultraspec 2000, Fa. Pharmacia Biotech; UV 1202, Shimadzu; Uvikon 930, Fa. Kontron Instruments) bestimmt.

Die Absorption der Nukleinsäuren wurde bei 260 nm gemessen und die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration (}\mu\text{g/ml)} = \text{Absorption}_{\lambda 260} \times 40$$

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren errechnet sich aus dem Verhältnis $\text{Absorption}_{\lambda 260} / \text{Absorption}_{\lambda 280}$. Qualitativ reine RNA weist nach SAMBROOK et al. (1989) einen Quotienten von 2,000 auf.

2.2.6.9 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Native Gelelektrophorese

Zur Größenbestimmung von Nukleinsäurefragmenten und zur Überprüfung der Reinheit der Nukleinsäuren wurden diese in 1 %igen Agarosegelen elektrophoretisch getrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Standard-Gelkammer (Gelgröße 10 x 10 cm) der Fa. Biometra und in einer Mini-Gelkammer der Fa. Bio-Rad. Gelkammer, Gelträger und Kamm waren für mindestens 30 min in 1 %iger SDS-Lösung zu inkubieren um RNase-frei zu sein. Zur gelelektrophoretischen Trennung wurde die Agarose in 1 x TBE-Puffer durch Kochen gelöst und in den Gelträger gegossen. Die Proben wurden mit 1/5 des Vol. mit Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandards wurden die DNA-Molekulargewichtsmarker 50 bp, 100 bp, 1 kb (Fa. Fermentas) sowie pUC Mix-Marker (Fa. Fermentas) und Lambda-DNA aus eigener Präparation verwendet. Die Trennung erfolgte in einem 1 x TBE-Puffer bei 80-100 V für mindestens 1 h. Nach Ethidiumbromidfärbung wurden die Nukleinsäurebanden auf einem UV-Tisch visualisiert und dokumentiert (BioDocAnalyse, Fa. Biometra).

Puffer:

1 x TBE-Puffer: Tris (90 mM); Borsäure (90 mM); EDTA (2 mM, pH 8,0)

Probenpuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, (10 mM, pH 7,0); 50 % (v:v) Glycerol

Denaturierende Gelelektrophorese- Formaldehydgel

Ausgewählte Gesamt-RNA-Präparationen wurden in einem 1,5 %igen denaturierenden Formaldehydgel analysiert. Für ein Minigel (8,0 x 6,5 cm) wurden 0,75 g Agarose in 44 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ und 5 ml 10 x MOPS in einer Mikrowelle aufgeschmolzen. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 68 °C wurden 0,9 ml einer 37 %igen Formaldehydlösung zugesetzt. Das ausgehärtete Gel wurde für 15 min im Laufpuffer äquilibriert. Für die gelelektrophoretische Trennung wurden 2 µl Gesamt-RNA in 2 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ verdünnt, mit 1 µl 5 x Probenpuffer versetzt, 15 min bei 65 °C denaturiert und bis zum Probenaufrag auf Eis zwischengelagert. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Mini-Gelkammer (Fa. Bio-Rad) bei einer Spannung von 50 V für 2 h. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV- Licht mit Hilfe der Fotodokumentationsanlage GelValue UV Transilluminator (Fa. Syngene) ausgewertet und dokumentiert.

Puffer:

10 x MOPS: MOPS (200 mM); Natriumacetat (50 mM); EDTA (10 mM); pH 7,0

Laufpuffer: 1 x MOPS; 0,74 % (v/v) Formaldehyd

Probenpuffer (10 ml):

16 µl	gesättigte Bromphenolblau-Lösung
80 µl	EDTA (500 mM)
100 µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)
720 µl	Formaldehyd (37 %)
2 ml	Glycerol (100 %)
3084 µl	Formamid
4 ml	10 x MOPS

Denaturierende Gelelektrophorese- Glyoxal/ Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)-Gel

DsRNA wurde in Verbindung mit Northern-Blot-Analysen in einem Glyoxal/DMSO-Gel aufgetrennt. Für ein Minigel wurden 0,5 g Agarose in 50 ml Laufpuffer aufgeschmolzen und in den Gelträger gegossen. Gelkammer, Gelträger und Kamm wurden zuvor in 1 % SDS RNase-frei gemacht.

Zur Probenvorbereitung wurden folgende Reagenzien ad 30 µl pipettiert:

- 6 µl dsRNA (~20 ng)
- 1,5 µl 0,2 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 7,0
- 15 µl DMSO
- 6 µl 6 M (40 %) Glyoxal

Das Gemisch wurde für 1 h bei 50 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Nach dem Zusatz von 3 µl 10 x Ladepuffer wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Trennung erfolgt für 2 h bei 60 V. Das Gel wurde anschließend sofort auf eine Nylon-Membran geblottet (Kap. 2.2.12).

Puffer:

- Laufpuffer: NaH₂PO₄/Na₂HPO₄(10 mM); pH 7,0
- 10 x Ladepuffer (1ml): 0,25 mg Bromphenolblau
0,25 mg Xylencyanol FF
50 µl 10 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄; pH 7,0
500 µl Glyzerol

2.2.7 'Polymerase-Chain-Reaction' (PCR)

Für den Nachweis bekannter Krankheitserreger/Sequenzen wurden zwei verschiedene PCR-Verfahren angewendet:

- RT-PCR (CLR/V/Eberescheringfleckigkeit/dsRNA Stieleiche)
- IC-RT-PCR (TMV/ToMV)

2.2.7.1 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde mit RNA-komplementären Primern in einem 20 µl-Ansatz durchgeführt. Zunächst wurden 2-5 µg Gesamt-RNA mit 100 pmol Erststrangprimer in dem entsprechenden Volumen H₂O_{DEPC} für 5 min bei 70 °C (Gesamt-RNA) bzw. 95 °C (dsRNA) denaturiert. Danach wurde der Reaktionsansatz sofort auf Eis gestellt und unter Zusatz folgender Reagenzien für 1 h bei 42 °C inkubiert.

- 4 µl 5 x Reverse Transkriptase-Puffer (Fa. Fermentas)
- 2 µl dNTP (10 mM) (Fa. Fermentas)
- 20 U RNasin (Fa. Fermentas)
- 200 U M-MuLV-Reverse Transkriptase (Fa. Fermentas)

Die Reaktion wurde durch 10 min Erhitzen bei 70 °C beendet.

Die Erststrangsynthese aus dsRNA mit sequenzspezifischen Primern wurde in einem 100 µl Ansatz analog den Angaben in Kap. 2.2.9.2 durchgeführt. Im Anschluss an die Erststrangsynthese erfolgte die PCR (Kap. 2.2.7.3).

2.2.7.2 IC-RT-PCR

Als Probenmaterial für die IC-RT-PCR wurden aufgereinigte Viruspartikeln und Rohpresssaft aus krautigen und holzigen Pflanzen verwendet. Die Reaktionsgefäße wurden zunächst mit Antikörpern beschichtet (3 h bei 37 °C mit 50 µl Antikörperlösung 1:1000 verdünnt in Beschichtungspuffer). Vor dem Probenauftrag wurden die Gefäße dreimal mit 80 µl Waschpuffer gewaschen. Als Antigen wurden 50 µl des homogenisierten Probenmaterials 1:10 oder 1:5 (w/v) in Probenpuffer in den beschichteten Eppendorfgefäßen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für die anschließende RT-PCR (Kap. 2.2.7.1) wurden die Gefäße dreimal mit 80 µl Waschpuffer gewaschen.

Puffer: siehe ELISA Puffer (Kap. 2.2.5.1)

2.2.7.3 Einsatzmengen und PCR-Bedingungen

Standardgemäß wurden für alle PCR-Reaktionen 5-10 µl cDNA bzw. Bakterienmaterial einer Einzelkolonie sofern im Text nicht anders vermerkt in folgendem Reaktionsansatz amplifiziert:

- 5 µl 10 x PCR-Puffer (ohne MgCl₂) (Fa. Fermentas)
- 1,5 mM MgCl₂ (Fa. Fermentas)
- 1 µl dNTP (10 mM) (Fa. Fermentas)
- 50 pmol 'Forward'-Primer
- 50 pmol 'Reverse'-Primer
- 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Fermentas)
- ad 50 µl H₂O_{DEPC}

In Tab. 2.6 sind alle PCR-Programme unter Angabe der Zeitdauer und Temperatur der Initialen Denaturierung, Denaturierung, Anlagerung, Elongation sowie der Anzahl der Zyklen aufgeführt, die für die Amplifizierung mit sequenzspezifischen Primern verwendet wurden. Die Abschlusselongation erfolgte einheitlich für 5 min bei 72 °C.

Nach dem jeweils letzten PCR-Zyklus wurden die Proben sofort ligiert oder bis zu einer Woche bei 4 °C bzw. für einen Monat bei -20 °C gelagert.

Tab. 2.6: Daten der verwendeten PCR-Programme

*Denat.=Denaturierung; Init. Denat.=initiale Denaturierung

Primerpaar (Bezeichnung)	*Init. Denat Temperatur/ Zeitdauer	*Denat. Temperatur/ Zeitdauer	Anlagerung Temperatur/ Zeitdauer	Elongation Temperatur/ Zeitdauer	Zyklen Anzahl
ToMV und TMV	94 °C/5 min	94 °C/30 s	62 °C /45 s	72 °C/30 s	35
Tob-Uni	94 °C/5 min	94 °C/1 min	60 °C /45 s	72 °C/1 min	35
261RP/ 71FP	94 °C/5 min	94 °C/1 min	54 °C /45 s	72 °C/1 min	35
RW 1/ RW 2	94 °C/5 min	94 °C/1 min	45 °C/45 s	72 °C/1 min	30
Oak Cryp 1-3	95 °C/2 min	95 °C/30 s	55 °C/1 min	72 °C/1 min	40/30
M13 (pEZSeq™)	94 °C/5 min	94 °C/45 s	62 °C/1 min	72 °C/2 min	35
M13 (pGEM®-T Easy)	95 °C/5 min	95 °C/1 min	55 °C/1 min	72 °C/2 min	30/35

2.2.8 Klonierung von PCR-Produkten

2.2.8.1 Ligation

PCR-Produkte wurden über ein 'TA-Cloning' unter Verwendung des Kits pGEM®-T Easy Vector System kloniert. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben der Fa. Promega. Es wurden 0,5 µl Vektor eingesetzt. Die Transformation der rekombinanten Plasmide erfolgte in jeweils 200 µl chemisch kompetenten Zellen der *E. coli*- Stämme DH 5α, XL1 Blue oder JM 109 (Kap. 2.1.4).

2.2.8.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Erzeugung chemisch kompetenter Zellen wurden die Bakteriensuspensionen einer Glycerin-Stammlösung von DH 5α und XL1 Blue (-80 °C) mit einer Impföse auf eine LB-Agarplatte (Kap. 2.1.8) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zwei Einzelkolonien wurden zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen, die analog nach HANAHAN (1983) erfolgte, weiterverwendet.

Vor dem Einsatz wurde eine Testtransformation durchgeführt, um die Transformationseffizienz zu bestimmen. Diese sollte bei den selbst hergestellten kompetenten Zellen $1 \times 10^6/\mu\text{g}$ Plasmid-DNA betragen.

2.2.8.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation rekombinanter Plasmide wurden 200 µl kompetente Zellen (bei -80 °C gelagert) für 10 min auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 5-10 µl Ligationsansatz versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Hitzeschockbehandlung für 50 sec bei 42 °C. Anschließend waren die Zellen erneut für 5 min auf Eis zu inkubieren. Nach der Zugabe von 950 µl SOC-Medium (Kap. 2.1.8) wurden die transformierten Bakterienzellen durch kräftiges Schütteln (TH 25, Edmund Bühler, swip) für 90 min bei 37 °C zur Resistenzausbildung angeregt, anschließend

in einer Verdünnungsreihe (z.B. 50, 100, 200, 500 µl) auf LB-AIX-Agar (Kap. 2.1.8) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die rekombinanten Klone wurden zunächst mittels 'Blue-White Screening' vorselektiert und anschließend mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft (Kap. 2.2.7.3, Kap. 2.2.8.4).

2.2.8.4 Überprüfung rekombinanter Plasmide mittels Kolonie-PCR

Zur Kontrolle der Länge der klonierten Fragmente wurden die Klone in eine PCR mit vektorspezifischen M13-Primern eingesetzt. Dazu wurden die nach der Transformation gewachsenen weißen Einzelkolonien gepickt, auf eine LB-AIX-Platte (Kap. 2.1.8) überimpft und anschließend in einen 50 µl PCR-Ansatz (Kap. 2.2.7.3) suspendiert. Die Amplifikation erfolgte nach den in Kap. 2.2.7.3 angegebenen PCR-Programmen je nach eingesetztem Klonierungsvektor M13, pGEM®-T Easy oder M13, pEZSeq™. 10 µl des Reaktionsansatzes wurden in einem nativen Agarosegel überprüft (Kap. 2.2.6.9).

2.2.8.5 Restriktionsanalyse isolierter Plasmid-DNA

Zur Identifizierung und Mengenabschätzung der isolierten Plasmid-DNA (Kap. 2.2.6.5) wurde eine Restriktionsanalyse in folgendem Ansatz durchgeführt:

0,5-2 µg Plasmid-DNA

2 µl 10 x Restriktionspuffer

[0,5 µl 'Bovine Serum Albumin' (BSA), nur bei Restriktionsenzymen der Fa. Promega]

10 U Restriktionsendonuklease

ad 20 µl H₂O_{DEPC}

Der Restriktionsansatz wurde bei dem vom Hersteller angegebenen Temperaturoptimum für 1 h inkubiert und zur Analyse in einem 1 %igen nativen Agarosegel aufgetrennt (Kap. 2.2.6.9). Der Vektor pEZSeq™ wurde mit den Enzymen ECO RI und Hind III (Fa. Fermentas; Fa. Promega) linearisiert. Rekombinante Plasmide des Vektors pGEM®-T Easy wurden mit dem Enzym ECO RI restringiert.

2.2.8.6 Sequenzierung rekombinanter Plasmide und Auswertung

Die Sequenzierung der rekombinanten Plasmide wurde vom Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurologie der Universität Hamburg, der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin oder dem Institut für Biologie, Molekulare Biotechnologie, RWTH Aachen durchgeführt. Die Sequenzvergleiche erfolgten unter Verwendung der Programme BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), Clustal W (HIGGINS et al., 1994) und den Sequenzdatenbanken EMBL und NCBI. Phylogenetische Analysen wurden mit Hilfe der Programme Clustal X (THOMPSON et al., 1997) und TreeView 1.6.6 (PAGE, 1996) durchgeführt.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes von abgeleiteten Proteinen erfolgte auf Basis des Programmes PeptidMass (WILKINS et al., 1997; GASTEIGER et al., 2005).

2.2.9 Klonierung der dsRNA und Nukleokapsid-assoziierten Nukleinsäure

Zur Charakterisierung des unbekannten Agens aus Stieleichen wurde eine Erststrangsynthese der dsRNA und der angereicherten Nukleokapsid-Nukleinsäure mit hexameren Zufallsprimern bzw. DOP-Primern vorgenommen. Die cDNA wurde als Template in eine DOP-PCR eingesetzt (Kap. 2.2.9.4) oder nach der Zweitstrangsynthese direkt in einen 'Blunt End'-Vektor kloniert (Kap. 2.2.9.3).

2.2.9.1 Erststrangsynthese in Anlehnung an BENTHACK (2001)

Für die Erststrangsynthese wurden 15 ng dsRNA und 0,4 µg Zufalls-Primer für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach der Primerbindung an die dsRNA erfolgte die Reverse Transkription in folgendem Ansatz:

4 µl 5 x RT Reverse Transkriptase-Puffer (Fa. Fermentas)

2 µl dNTP (10 mM) (Fa. Fermentas)

20 U RNasin (Fa. Fermentas)

20 U MMuLV- Reverse Transkriptase (Fa. Fermentas)

ad 20 µl H₂O_{DEPC}

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt (Mastercycler Gradient, Fa. Eppendorf):

25 °C 10 min 1 °C/sec

37 °C 25 min 3 °C/sec

42 °C 25 min 3 °C/sec

Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt und 5-10 µl des Ansatzes in eine DOP-PCR eingesetzt (Kap. 2.2.9.4).

2.2.9.2 Erststrangsynthese modifiziert nach JELKMANN et al. (1989)

Die Erststrangsynthese von dsRNA erfolgte in einem Reaktionsansatz von 100 µl (Abb. 2.2). Als Erststrangprimer wurden DOP-Primer bzw. hexamere Zufalls-Primer eingesetzt. Die dsRNA wurde entweder unter Verwendung von DMSO oder durch Hitze denaturiert.

Denaturierung unter Verwendung von DMSO

Zur Denaturierung mit DMSO wurden etwa 30 ng dsRNA mit 0,8 µg DOP-Primer und 144 µl DMSO für 30 min bei 65 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Nach einer Fällung des Reaktionsansatzes über Nacht bei -80 °C (Kap. 2.2.6.7) wurde das Präzipitat mit folgenden Reagenzien ad 20 µl H₂O_{DEPC} versetzt:

- 4 µl 5 x Reverse Transkriptase-Puffer (Fa. Promega)
- 2 µl dNTP (10 mM) (Fa. Fermentas)
- 20 U RNasin (Fa. Fermentas)
- 37,5 U AMV-Reverse Transkriptase (Fa. Promega)

Hitzedenaturierung

330 ng dsRNA bzw. 10 µl aufgereinigte Nukleokapsid-Fraktion wurden mit 0,8 µg DOP-Primer oder 0,9 µg hexamerem Zufalls-Primer in einem Reaktionsvolumen ad 100 µl H₂O_{DEPC} für 5 min bei 95 °C denaturiert.

Nach der Denaturierung wurde der Reaktionsansatz sofort auf flüssigem Stickstoff gefroren und mit folgenden Reagenzien versetzt:

- 20 µl 5 x Reverse Transkriptase-Puffer (Fa. Promega)
- 2 µl dNTP (10 mM) (Fa. Fermentas)
- 20 U RNasin (Fa. Fermentas)
- 37,5 U AMV-Reverse Transkriptase (Fa. Promega)

Die Reverse Transkription wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- 10 min RT
- 20 min 37 °C
- 15 min 42 °C danach nochmals 37,5 U AMV-RT zusetzen
- 30 min 42 °C

Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch 10 min Erhitzen bei 70 °C. Die cDNA wurde über Nacht bei -80 °C gefällt (Kap. 2.2.6.7) und in der DOP-PCR partiell amplifiziert. In einem alternativen Versuchsansatz wurde die cDNA zur Zweitstrangsynthese eingesetzt.

2.2.9.3 Zweitstrangsynthese und Klonierung der cDNA

Die Zweitstrangsynthese und Klonierung der cDNA erfolgte nach Herstellerangaben des Universal RiboClone® cDNA Synthesis Kit, Fa. Promega.

Zweitstrangsynthese

Die cDNA wurde nach der Ethanolfällung in 100 µl Zweitstrang-Mix gelöst.

- 40 µl 2,5 x Zweitstrang-Puffer *
- 1 µl dNTP (10 mM), (Fa. Fermentas)
- 25 U DNA-Polymerase 1, (Fa. Fermentas)
- 1,25 U RNase H, (Fa. Fermentas)
- 3 U T4 DNA-Ligase, (Fa. Fermentas) (nur für Probe E 841)
- ad 100 µl H₂O_{DEPC}

* Tris-HCl (100 mM); KCl (225 mM); MgCl₂ (7,5 mM); DTT (7,5 mM); BSA (125 µl/ 10 ml Puffer)

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 14 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte für 10 min bei 70 °C. Die Proben wurden danach sofort auf Eis gestellt.

'Blunt End Polishing'

Vor der 'Blunt End'-Klonierung wurde die durch Zweitstrangsynthese entstandene dsDNA für 10 min bei 37 °C mit 2,5 U T4-DNA-Polymerase inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 10 min bei 70 °C. Anschließend wurden 10 U T4-Polynukleotidkinase und 2,5 µl ATP (40 µM) zugesetzt und eine Inkubation von 30 min bei 37 °C durchgeführt. Die Probe wurde auf Eis überführt und nach Herstellerangaben mit dem NukleoSpin® Extract Kit (Fa. Macherey & Nagel) aufgereinigt (Kap. 2.2.6.3). Die Eluierung erfolgte mit 50 µl Eluierungspuffer. Zur Aufkonzentrierung der dsDNA wurde die Probe erneut über Nacht bei -80 °C gefällt (Kap. 2.2.6.7). Das Sediment wurde in 6,5 µl H₂O_{DEPC} gelöst und nach Herstellerangaben in den 'Blunt End'-Vektor pEZSEq™ (Fa. Lucigen) ligiert. Die Transformation der rekombinanten Plasmide erfolgte wie in Kap. 2.2.8.3 beschrieben.

2.2.9.4 DOP-PCR modifiziert nach ROCHE (1999)

Alternativ zur Zweitstrang-Synthese wurde der RNA-DNA-Hybrid in einer DOP-PCR amplifiziert (Abb. 2.3). Dafür wurden zwei verschiedene Reaktionsansätze verwendet, die in Tab. 2.7 dargestellt sind.

Tab. 2.7: DOP-PCR-Ansätze

	Ansatz 1	Ansatz 2
cDNA	5-10 µl	10-15 µl
10 x PCR-Puffer (mit 15 mM MgCl ₂) (Fa. Promega)	5 µl	10 µl
MgCl ₂ -Endkonzentration (Fa. Fermentas)	1,5 mM	2,5 mM
dNTP (10 mM) (Fa. Fermentas)	2 µl	4 µl
DOP-Primer	200 pmol	200 pmol
Taq-Polymerase (Fa. Promega)	5 U	5 U
H ₂ O _{DEPC}	ad 50 µl	ad 100 µl

Die DOP-PCR wurde mit zwei verschiedenen Programmen im Mastercycler Personal (Fa. Eppendorf) und im Robocycler (Fa. Stratagene) durchgeführt.

DOP-PCR-Programm für Ansatz 1 (ROCHE, 1999):

5 min	95 °C	
1 min	94 °C	
1,5 min	30 °C	
3 min	30 °C → 72 °C (3,5 °C/s)	5 Zyklen
3 min	72 °C	
1 min	94 °C	35 Zyklen
1 min	62 °C	
2 min	72 °C (+14s/Zyklus)	
7 min	72 °C	

DOP-PCR-Programm für Ansatz 2 (modifiziert):

2 min	94 °C	
1 min	94 °C	
1 min	30 °C	5 Zyklen
2 min	72 °C	
1 min	94 °C	35 Zyklen
1 min	50 °C	
3 min	72 °C	
7 min	72 °C	

10 µl des Ansatzes wurden im Agarosegel überprüft (Kap. 2.2.6.9). Das PCR-Produkt wurde vor der Klonierung in den Vektor pGEM®-T Easy in einem präparativen Agarosegel getrennt und aufgereinigt (Kap. 2.2.6.3) oder durch Fällung aufkonzentriert (Kap. 2.2.6.7).

dsDNA Synthese nach PROMEGA (1996)

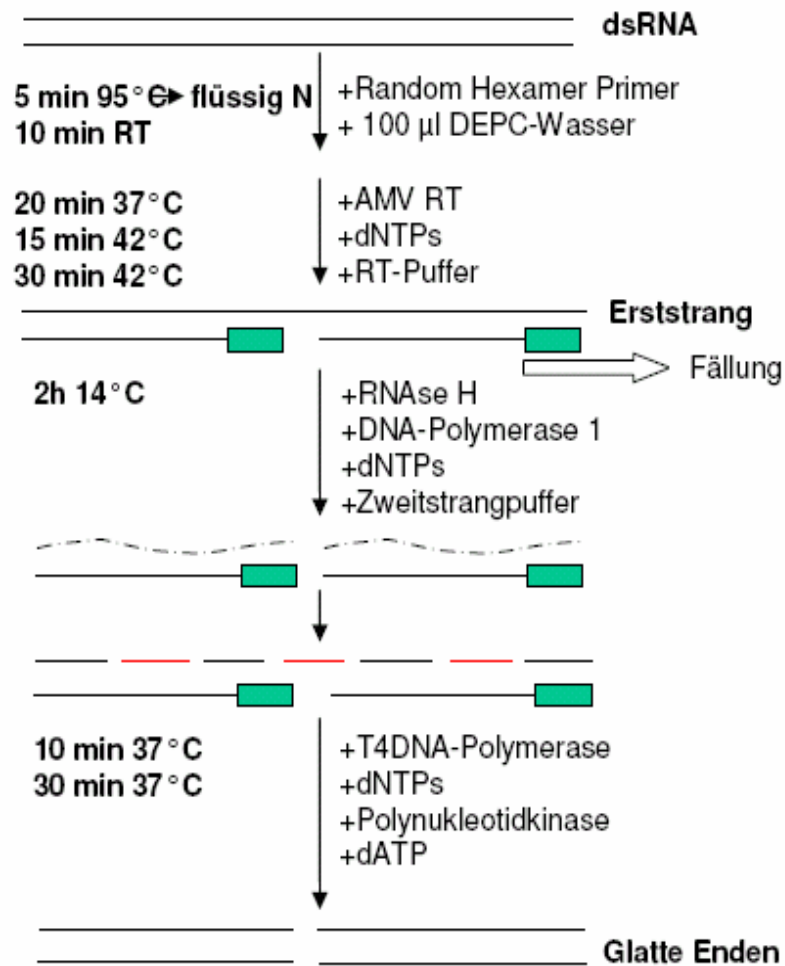


Abb. 2.2 Schema der cDNA Synthese nach Promega

RT-DOP-PCR modifiziert nach ROCHE (1999)

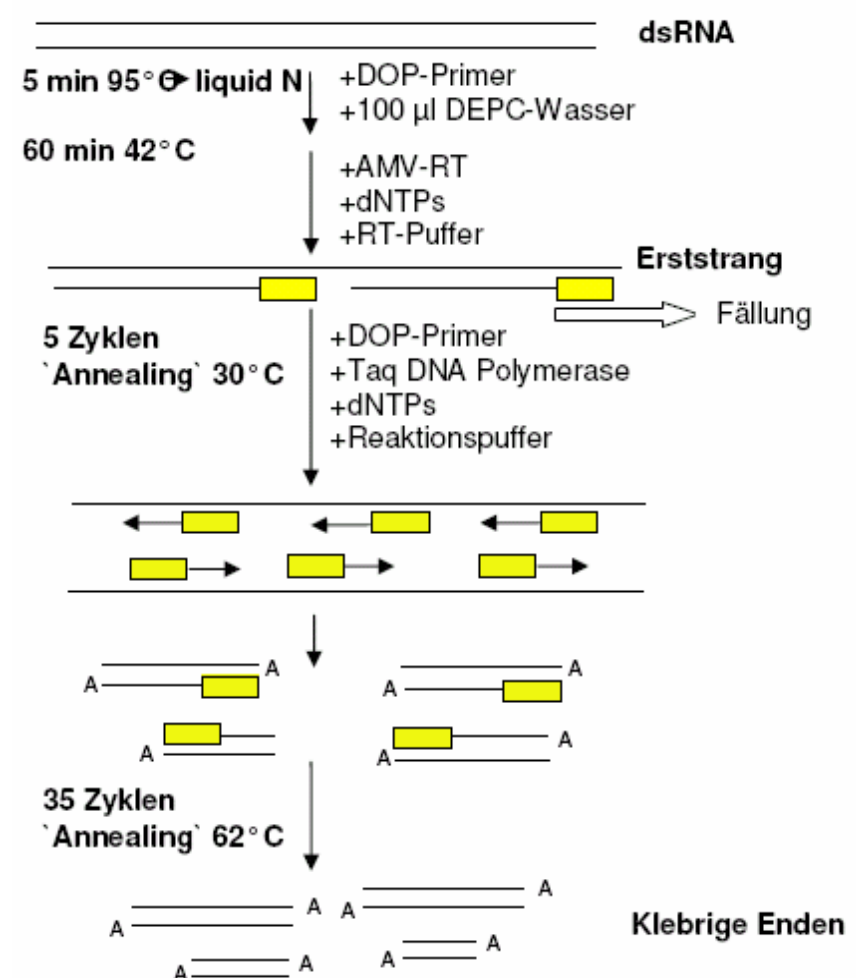


Abb. 2.3 Schema der RT-DOP-PCR nach Roche

2.2.10 Herstellung Digoxigenin (DIG)-markierter Sonden

Dig-markierte DNA-Sonden ausgewählter Klone wurden unter Verwendung isolierter Plasmid-DNA in einer PCR-Reaktion mit klonspezifischen oder vektorspezifischen M13-Primern gewonnen. Die Markierung erfolgte mit dem PCR-DIG-Probe Synthesis Kit (Fa. Boehringer Mannheim).

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

100 ng Plasmid

10 µl 10 x PCR-Puffer (ohne $MgCl_2$) (Fa. Fermentas)

1,5 mM $MgCl_2$ (Fa. Fermentas)

5 µl PCR-DIG-Probe Synthesis Mix (Fa. Boehringer Mannheim)

50 pmol 'Forward'-Primer

50 pmol 'Reverse'-Primer

2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Fermentas)

ad 50 µl H_2O_{DEPC}

Zur Überprüfung der Sonde wurden 10 µl des Ansatzes in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Kap. 2.2.6.9).

2.2.11 Spot-Blot

Zur Konzentrationsbestimmung der DIG-markierten Sonden, wurde jeweils 1 µl der DIG-markierten DNA in einer Verdünnungsreihe (100 pg/µl; 10 pg/µl; 1 pg/µl; 0,1 pg/µl; 0,01 pg/µl) auf eine Nylon-Membran vom Typ Nytran® 0,2 (Fa. Schleicher & Schuell) pipettiert. Die Membran wurde zur Fixierung der markierten DNA für 30 min bei 120 °C gebacken und anschließend detektiert (Kap. 2.2.12).

2.2.12 Northern-Blot und-Hybridisierung

Mittels Northern-Hybridisierung sollte überprüft werden, ob die DIG-markierten Sonden aus Klonen einer RT-DOP-PCR mit der dsRNA hybridisierten. Dazu wurde dsRNA im 1 %igen Agarosegel oder im Glyoxalgel aufgetrennt (Kap. 2.2.6.9). Der 'Northern Blot' erfolgte unter RNase-freien Bedingungen.

Gelvorbereitung

Für den 'Northern Blot' wurde die dsRNA für drei Stunden in einem Agarose-Minigel (8,0 x 6,5 cm) bei 50 V in 1 x TBE aufgetrennt (Kap. 2.2.6.9), zur Denaturierung der dsRNA für 15 min in 0,05 N NaOH geschwenkt und anschließend für 15 min in 20 x SSC-Puffer neutralisiert.

Da die dsRNA im Glyoxalgel bereits während des Gellaufs durch DMSO denaturiert wurde, konnte das Gel ohne weitere Behandlung für den 'Northern Blot' eingesetzt werden.

Vorbereitung der Membran

Vor dem Transfer wurde eine Nylon-Membran (Nytran® 0,2 Fa. Schleicher & Schuell) auf die Gelgröße zugeschnitten, kurz in Wasser gelegt und 5 min in Transferpuffer inkubiert.

Kapillarblot

Der Transfer der Nukleinsäuren vom Gel auf die Membran erfolgte über Nacht in einem Kapillarblot. Dazu wurden 500 ml Transferpuffer eingesetzt. Als Transferpuffer für Agarosegele wurde 20 x SSC-Puffer (SAMBROOK et al., 1989) verwendet. Für den 'Northern Blot' mit Glyoxalgele wurde eine 7,5 mM NaOH-Lösung (VRATI et al., 1987) eingesetzt. Anschließend wurde die Membran für 1-2 min in Waschlösung 1 gewaschen. Die Fixierung von dsRNA aus Agarosegelen an die Membran erfolgte für 2 h bei 80 °C. Beim Transfer vom Glyoxalgele ist die dsRNA bereits durch die Verwendung eines alkalischen Puffers an die Membran gebunden worden.

Hybridisierung:

Die Membran wurde für 30 min im vorgewärmten Hybridisierungspuffer bei 55 °C drehend inkubiert (Herahybrid 12, Fa. Heraeus). Anschließend wurde die markierte DNA-Sonde für 5 min bei 95 °C denaturiert, sofort für 5 min auf Eis gestellt und dem Hybridisierungspuffer zugesetzt. Um eine Bindung der Sonde an die dsRNA zu erreichen, wurde die Membran über Nacht in der Hybridisierungslösung bei 50 °C drehend inkubiert.

Detektion:

Vor der Detektion wurde die Membran 2 x 5 min bei RT in Waschlösung 2 und 2 x 15 min bei 55 °C in Waschlösung 3 schwenkend inkubiert (Belly Dancer, Fa. Stovall; Herahybrid 12, Fa. Heraeus). Anschließend wurde die Membran für 1-5 min in 50 ml Maleinsäurepuffer und für 30 min in Blocklösung geschwenkt (Belly Dancer, Fa. Stovall). Der Blocklösung wurde nachfolgend das Anti-DIG AP-Konjugat (1:5000) zugesetzt und die Membran erneut für 30 min darin geschwenkt (Belly Dancer, Fa. Stovall). Es folgte ein Waschschriff (2 x 15 min in Maleinsäurepuffer), bevor die Membran für 2-5 min in Detektionspuffer äquilibriert und in 10 ml Färbelösung abgedeckt inkubiert wurde bis die Banden sichtbar wurden. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch 5-20 min Spülung in Wasser. Zur Dokumentation wurde die Membran mit einer Spiegelreflexkamera (EOS 300, Fa. Canon) fotografiert, anschließend in Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

Puffer und Lösungen:

	Agarosegel	Glyoxalgele
Transferpuffer:	20 x SSC	NaOH (7,5 mM)
Waschlösung 1:	20 x SSC	2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS
Prä-/Hybridisierungspuffer:	5 x SSC; 7 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Formamid; 2 % (w/v), 'Blocking Reagent' (Fa. Boehringer Mannheim); 0,1 % (w/v) N-Laurylsarcosin; NaH ₂ PO ₄ (50 mM pH 7,0)	

20 x SSC-Puffer:	NaCl (3 M); Na-Citrat (0,3 M pH 7,0)
Detektionspuffer:	Tris (0,1 M, pH 9,5); NaCl (0,1 M); MgCl ₂ (50 mM)
Maleinsäurepuffer:	Maleinsäure (0,1 M); NaCl (0,15 M)
Blocklösung:	1 % 'Blocking Reagent' in Maleinsäurepuffer
Waschlösung 2:	2 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung 3:	0,1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS
Färbelösung:	10 ml Detektionspuffer; 45µl NBT ⁴ (75 mg/ml); 35 µl (75 mg/ml) BCIP ⁵

2.2.13 Dot-Blot-Hybridisierung in Anlehnung an SAMBROOK et al. (1989)

10 µl dsRNA wurden mit 20 µl Formamid, 7 µl Formaldehyd (37 %, v/v), 2 µl 2 x SSC und 1 µl H₂O_{DEPC} versetzt, für 15 min bei 68 °C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und mit der doppelten Menge 20 x SSC-Puffer gemischt. Die denaturierte dsRNA wurde in 2 µl Tropfen schrittweise auf die trockene Nylon-Membran (Nytran® 0,2 Fa. Schleicher & Schuell) pipettiert und durch 2 h Erhitzen auf 80 °C an der Membran fixiert. Hybridisierung und Detektion erfolgten wie in Kap. 2.2.12 angegeben.

⁴ NBT: Nitroblautetrazolium

⁵ BCIP: 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat

3 ERGEBNISSE

3.1 Stieleichen mit virusverdächtigen Symptomen in Nord- und Mitteldeutschland

Zu den virusverdächtigen Symptomen an Stieleichen gehören chlorotischen Ringflecken, Scheckungen und mosaikartige Blattverfärbungen, die im Untersuchungszeitraum von 2001 bis 2004 an allen in Kap. 2.1.1 aufgeführten Probenahmestandorten in Nord- und Mitteldeutschland zu beobachten waren. Die Symptome waren ungleichmäßig über die Baumkronen verteilt. In einer Erhaltungssämlingsspenderplantage für Stieleichen in NRW, FA Hilchenbach traten die virusverdächtigen Symptome im Zeitraum der laufenden Untersuchungen von 2001 bis 2003 häufig nur an einzelnen Blättern auf. Die Stieleichen am Standort SN, FA Dresden-Nord zeigten an ganzen Astpartien virusverdächtige Symptome. Die beobachteten Krankheitsbilder, sowie die Anzahl bonitierter und erkrankter Stieleichen sind unter Angabe des Probenahmestandortes in Tab. 3.1 aufgeführt.

Der Beginn und die Intensität der Symptomentwicklung waren witterungsabhängig und veränderten sich im zeitlichen Verlauf der Vegetationsperiode. Nach Bonituren ausgewählter Bäume an den Berliner Standorten (B 1-3) waren die ersten Symptome zum Zeitpunkt des Blattaustriebes Mitte Mai zu beobachten. Hellgrüne, scharf abgegrenzte chlorotische Ringflecken hoben sich nur undeutlich von der Ausfärbung der jungen Eichenblätter ab (Abb. 3.1, Bild 1). Im späteren Verlauf veränderten sich die Ringflecken zu gelben abgegrenzten Chlorosen, deren Gewebe ab Ende Juli verstärkt Nekrosen aufzeigte (Abb. 3.1, Bild 2).

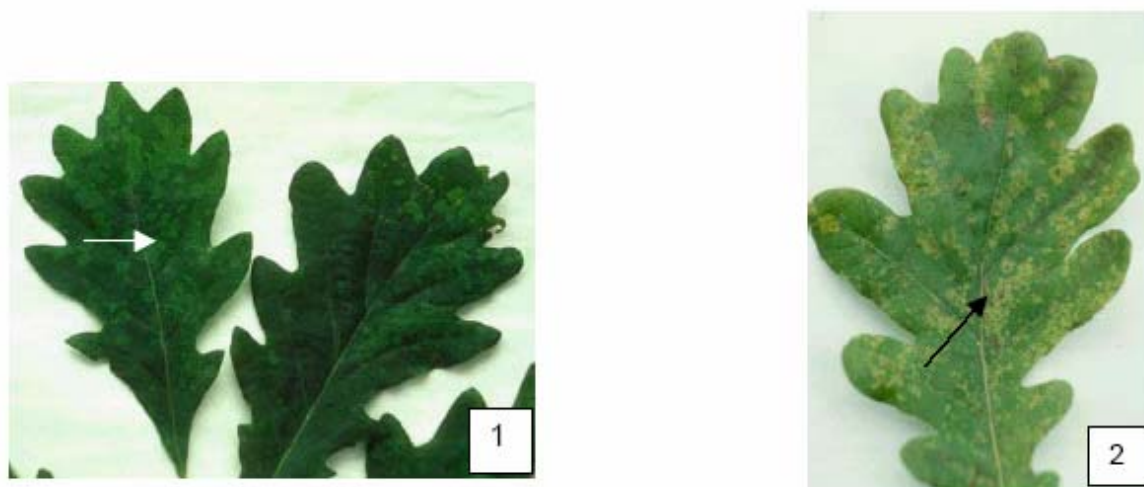


Abb. 3.1 Virusverdächtige Symptome an Stieleichenblättern zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten.

Bild 1) hellgrüne, scharf abgegrenzte Ringflecken (E 825, Probenahme: 22.05. 2003)

Bild 3) hellgelbe Ringflecken und distinkte Läsionen mit Nekrosen (E 637, Probenahme: 31.07.2002)

Tab. 3.1: Anzahl der erkrankten Stieleichen im Untersuchungszeitraum 2001-2004 an den ausgewählten Probenahmestandorten unter Angabe der Anzahl der bonitierten Gehölze und der beobachteten Symptombilder

(-)= nicht bonitiert, RF=chlorotische Ringflecken, cRF=gelb-chlorotische Ringflecken, S=Scheckung, M=mosaikartige Blattverfärbungen, dL=distinkte, nekrotische Läsionen, RF-C=chlorotische Ringflecken +Chlorosen, cRF-dL=chlorotische Ringflecken+distinkte, nekrotische Läsionen

Standort	Anzahl bonitierter Gehölze	Anzahl erkrankter Gehölze				Symptome
		2001	2002	2003	2004	
B 1	20	-	4	5	5	S, RF
B 2	20	-	4	4	4	RF
B 3	30	-	4	10	-	RF, RF-C
HH, Staatsforst (SF) Klövensteen	16	-	4	4	-	RF, RF-dL
SH, FA Rantzau, Abt. 102 A1	4	-	1	-	-	RF
NDS, (FA Braunschweig), RFö Kampen, Abt. 78 a ²	50	-	3	-	-	M, RF
NDS, (FA Neuenburg), RFö Hopels, Abt. 1500 A	50	-	8	3	-	RF-dL, RF
NDS, (FA Neuenburg), RFö Hopels, Abt. 1496	40	-	3	3	-	M, RF
NRW, FA Hilchenbach, Erhaltungssamenplantage	502	40	28 + tot: 27	26 + tot: 30	-	RF
NRW, FA Arnsberg, Abt. 289 und 290	50	5	7	9	-	S, RF
NRW, Hauberg (Kreuztal)	30	3	6	3	-	RF-C, RF
SN, FA Dresden-Nord, Abt. 250 a ²	30	-	8	12	15	cRF-dL

Wie Tab. 3.1 zeigt, konnten in den jährlichen Bonituren der Stieleichen an den Standorten NRW, FA Arnsberg; SN, FA Dresden-Nord, B1 und B 3 über einen Zeitraum von zwei bzw. drei Jahren eine Zunahme von Gehölzen mit virusverdächtigen Symptomen in den Beständen festgestellt werden. In NDS, RFö Hopels, Abt. 1500 sowie NRW, Hauberg hingegen waren im Jahr 2003 weniger erkrankte Gehölze zu beobachten als im Vorjahr. An den Standorten HH, SF Klövensteen und B 2 blieb die Anzahl der markierten Stieleichen mit virusverdächtigen Blattsymptomen in den Jahren 2002-2003 bzw. 2004 gleich.

Am häufigsten trat das Symptombild der chlorotischen Ringflecken, z.T. auch gemischt mit Chlorosen oder distinkten nekrotischen Läsionen, wie am Standort B3 in Berlin (E 538), in

NRW, Hauberg (E 555); in NDS, RFö Hopels (E 1722, E 632-E 634); HH, SF Klövensteen (E 637) und SN, FA Dresden-Nord (E 826, E 878) beobachtet, auf (Tab. 3.1, Tab. A1, Anhang 4). Die Intensität der chlorotischen Ringflecken unterschied sich in Abhängigkeit des Standortes. Am Standort SN, Dresden-Nord wurden gelb-chlorotische, scharf abgegrenzte Ringflecken und distinkte nekrotische Läsionen bereits ab Mai an den Blättern erkrankter Stieleichen erfasst (E 826) (Abb. 3.1, Tab. A1, Anhang 4).

In der Größe der chlorotischen Ringflecken konnten Varianten zwischen 2-3 mm (E 863, E 1181, E 1743, B1; Abb. 3.3, Bild 1) und 4 mm (Baum 66, NRW, Hauberg; Abb. 3.3, Bild 2) beobachtet werden.



Abb. 3.2 Gelb-chlorotische, scharf abgegrenzte Ringflecken und distinkte Läsionen, die an Blättern einer infizierten Stieleiche am Standort SN, FA Dresden-Nord (E 826) im Mai 2003 zu beobachten waren.

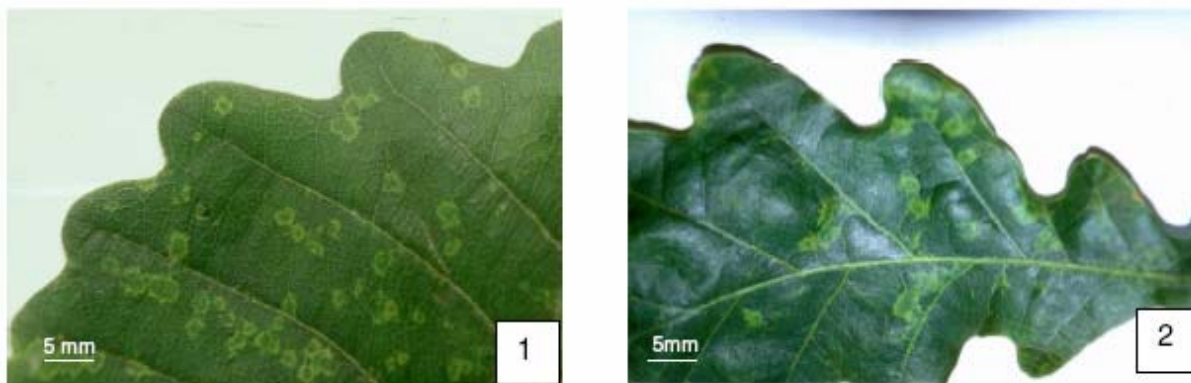


Abb. 3.3 Chlorotische Ringflecken unterschiedlicher Größe an Blättern erkrankter Stieleichen.

Bild 1) Scharf abgegrenzte chlorotische Ringflecken von 2-3 mm am Blattausschnitt einer erkrankten Stieleiche vom Standort B 1 (E 863).

Bild 2) Ca. 4 mm große, teilweise ineinander verlaufende Ringflecken am Blatt einer infizierten Stieleiche am Standort NRW, Hauberg (Baum 66).

Erkrankte Stieleichen traten an verschiedenen Standorten vergesellschaftet mit anderen Forstgehölzen auf, die ebenfalls virusverdächtige Blattsymptome aufwiesen. An den Standorten NRW, Hauberg und SN, FA Dresden-Nord konnten in benachbarten Birken und Holunder chlorotische Linienmustern und Blattflecken beobachtet werden.

Ebereschen, mit chlorotischen Ringflecken und Scheckungen, die dem Symptombild an Stieleichen ähneln, kamen an den Standorten HH, SF Klövensteen und B 1 mit erkrankten Stieleichen vergesellschaftet vor.

Häufig gingen mit den virusverdächtigen Blattsymptomen geringe Jahreszuwächse und Absterbeerscheinungen bis hin zum Totalausfall der Bäume einher. Dieses Krankheitsbild fiel besonders in der Sämlingsspendeplantage in NRW, FA Hilchenbach auf (Tab. 3.1).

3.2 Untersuchungen zur Übertragbarkeit des Erregers

Biotest

Durch mechanische Inokulation (Kap. 2.2.1.1) von 20 Homogenaten erkrankter Stieleichen mit verschiedenen Blattsymptomen und durch Trockeninokulation von Blättern, Rinde und Knospen zweier Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken (E 1144, E 825) gelang es nicht, den Erreger zu übertragen und virusverdächtige Symptome auf *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana tabacum* zu induzieren. In transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen von Adsorptionspräparaten der inokulierten Testpflanzen konnten keine Viruspartikeln nachgewiesen werden.

Saatgutübertragbarkeit

Zur Überprüfung der Saatgutübertragbarkeit des ringfleckeninduzierenden Erregers an Stieleichen wurden im Dezember 2001 je 20 Eicheln symptomtragender (E 338-E 341) und symptomloser Stieleichen (E 342, E 343) vom Standort B 3 in einem lockeren Torf-Sandgemisch ausgelegt und im Folienzelt kultiviert (Kap. 2.2.1.4).

Im Vergleich der Keimfähigkeit des Saatgutes von infizierten und gesunden Stieleichen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Unabhängig vom äußeren Erscheinungsbild der Gehölze wurde eine Keimfähigkeit von 85 % ermittelt.

Im September des Versuchsjahres 2002 traten vereinzelt chlorotische Ringflecken an den Blättern eines Sämlings der Probe E 341 auf (Abb. 3.4). In einem Adsorptionspräparat der homogenisierten Gewebebereiche mit den virusverdächtigen Symptomen ließen sich jedoch elektronenoptisch keine Viruspartikeln nachweisen.



Abb. 3.4 Chlorotische Ringflecken an Sämling der Probe E 341.

Sechs krautige Testpflanzen der Arten *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana glauca* und *Nicotiana clevelandii* sind als Fangpflanzen zur Überprüfung der Bodenübertragbarkeit des Erregers im Juni 2003 in Bodenproben gepflanzt worden, die im Wurzelraum erkrankter Stieleichen am Standort B 1 entnommen worden waren (Kap. 2.2.1.2). 14 Tage später zeigten sich auf den Blättern einer *Chenopodium quinoa*-Pflanze chlorotische Ringflecken und nekrotische Lokalläsionen (Abb. 3.5). In transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen von drei angefertigten Adsorptionspräparaten der symptomtragenden Blattausschnitte sowie in Wurzelproben konnten keine Viruspartikeln nachgewiesen werden. Der Erreger ließ sich in wiederholten Übertragungsversuchen nicht weiter auf krautigen Indikatorpflanzen propagieren.

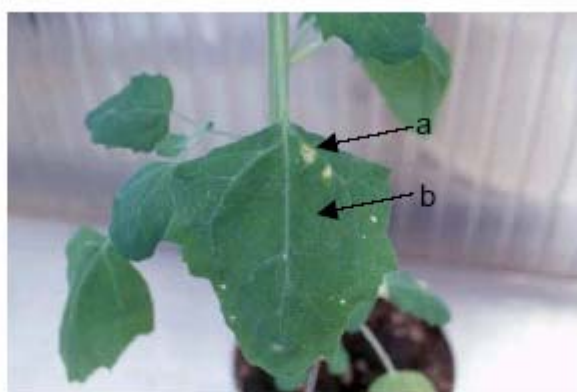


Abb. 3.5 Nekrotische Lokalläsionen (a) und chlorotische Ringflecken (b) an *Chenopodium quinoa*, die zur Überprüfung der Bodenübertragbarkeit des unbekannten Erregers in Bodenproben des Standortes B 1 gepflanzt worden war. Symptomentwicklung nach 14 Tagen.

3.3 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von Blatthomogenaten erkrankter Stieleichen

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen sollten Aufschluss über die Partikelmorphologie des bisher unbekannten viralen Erregers in Stieleichen geben, auf deren Grundlage sich Hinweise auf die taxonomische Zuordnung eines Virus ableiten lassen.

Von Eichenblattproben mit unterschiedlicher Symptomausprägung sowie aus Knospen-, Samen- und Rindengewebe erkrankter Stieleichen wurden nach der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Methode Adsorptionspräparate angefertigt und im Elektronenmikroskop untersucht. Als Kontrolle wurden zusätzlich Adsorptionspräparate von Blättern symptomloser Stieleichen hergestellt. In sieben Proben (E 146, E 151, E 340, E 552, E 619, E 1739, E 1743) von 20 bonitierten Adsorptionspräparaten erkrankter Stieleichen mit variierenden Symptombildern und von unterschiedlicher Herkunft konnten im Transmissionselektronenmikroskop isometrische Partikeln nachgewiesen werden. Die Partikeln mit einer Größe von etwa 30 nm bis 40 nm zeigten keine scharfe Begrenzung auf. Als Beispiele sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Blatthomogenaten zweier erkrankter Stieleichen in Abb. 3.6 und 3.8 dargestellt. Ein starres Stäbchen mit einer Größe von ca. 120 nm wurde neben isometrischen Partikeln im Adsorptionspräparat einer Stieleiche mit Mosaiksymptomen (E 619) gefunden (Abb. 3.8, Bild 1). Im Blatthomogenat eines Baumes mit chlorotischen Ringflecken und distinkten Läsionen (E 632) war ein flexibler Partikel mit einer Länge von etwa 450 nm zu beobachten (Abb. 3.7).

Durch verschiedene Virusaufräumarbeiten (Kap. 2.2.3) konnten isometrische und stäbchenförmige Viruspartikeln angereichert werden (siehe Kap. 3.4.2 und Kap. 3.4.4).

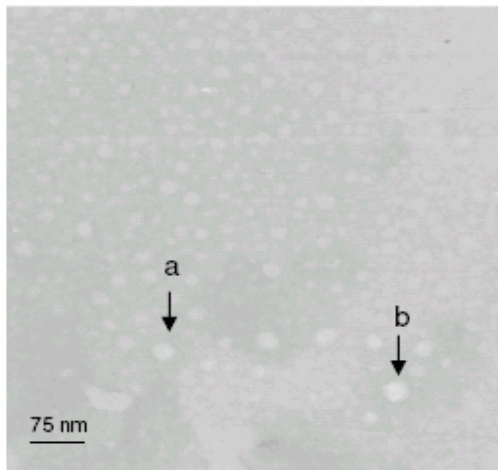


Abb. 3.6 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Adsorptionspräparates von Blattmaterial einer Stieleiche mit chlorotischen Ringflecken (E 1743).
a) isometrisches Partikel ca. 30 nm
b) isometrisches Partikel ca. 40 nm
Vergrößerung: 40.000 x

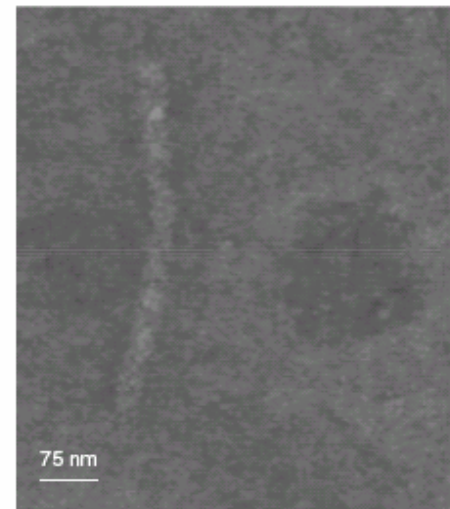


Abb. 3.7 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Adsorptionspräparates von Blattmaterial einer Stieleiche mit chlorotischen Ringflecken (E 632).
Flexibles Partikel ca. 450 nm
Vergrößerung: 40.000 x

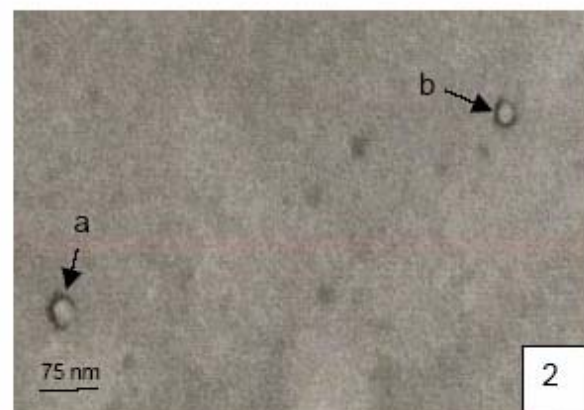
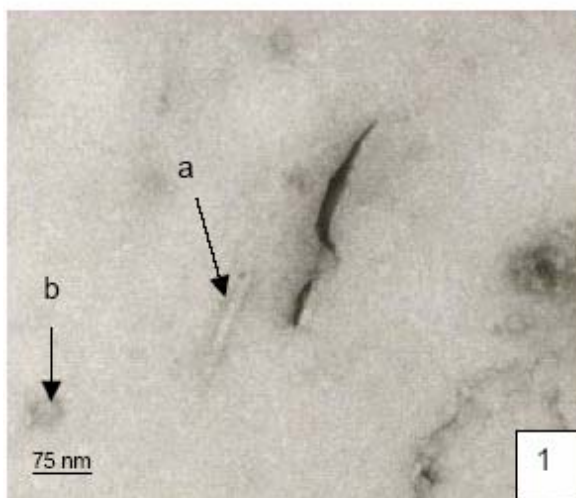


Abb. 3.8 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Adsorptionspräparates von Blattmaterial einer Stieleiche mit mosaikartigen Blattverfärbungen (E 619).

Bild 1: a) stäbchenförmiges Partikel ca. 120 nm

b) isometrisches Partikel ca. 40 nm

Bild 2: a) isometrisches Partikel ca. 40 nm

b) isometrisches Partikel ca. 30 nm

Vergrößerung: 40.000 x

3.4 Anreicherung viraler Komponenten aus Stieleiche

3.4.1 Anreicherung von Viruspartikeln und Nachweis von Viren in einer RT-PCR

Anreicherung von Viruspartikeln

Aus Pflanzenproben, in denen elektronenmikroskopisch Partikeln nachweisbar waren (Kap. 3.3) wurde versucht, Viruspartikeln durch unterschiedliche Reinigungsverfahren anzureichern (Kap. 2.2.3.1) und auf krautige Indikatoren zu übertragen (Kap. 2.2.1.1). Partikelanreicherungen wurden ebenfalls mit Proben durchgeführt, die durch ausgeprägte Symptomatik auffielen oder vergesellschaftet mit anderen virusinfizierten Forstgehölzen auftraten (Tab. A1, Anhang 4).

Im Adsorptionspräparat vom Blatthomogenat einer infizierten Stieleiche (E 632) mit chlorotischen Ringflecken konnte ein flexibles Partikel detektiert werden (Abb. 3.7), dessen Morphologie denen der Potyviren ähnelte. Mit einem Aufreinigungsverfahren nach DIJKSTRA et al. (1996) (Kap. 2.2.3.1) wurde geprüft, ob das Symptombild der Ringfleckigkeit möglicherweise durch eine Infektion dieser Virusfamilie hervorgerufen wird. Aus Blättern mit chlorotischen Ringflecken der Probe E 533 konnten mit dieser Methode keine Viruspartikeln angereichert werden.

Für den Versuch der Anreicherung isometrischer Viruspartikeln wurde das Reinigungsverfahren nach HENTSCH (1998) (Kap. 2.2.3.1) verwendet, welches für die Isolierung sphärischer Partikeln aus Rosskastanie optimiert worden war. Isometrische Viruspartikeln mit Größen von 30-40 nm konnten in Adsorptionspräparaten von Blättern mit einem Mosaik (E 619, Abb. 3.8) und mit chlorotischen Ringflecken (E 151, E 552) detektiert werden (Kap. 3.3). Um zu testen, ob sich isometrische Partikeln auch aus Blättern mit Chlorosen anreichern ließen, wurden 50 g Blattmaterial der Probe E 153 ebenfalls nach HENTSCH (1998) aufgereinigt. Aus Blattmaterial der Proben E 151 und E 152 konnten mit dieser Methode neben isometrischen Partikeln, stäbchenförmige Viruspartikeln mit einer Länge von 350-400 nm isoliert werden (vgl. Kap. 3.4.3). In einem Adsorptionspräparat des aufgereinigten Blattextraktes der Probe E 619 wurden dünne, fadenförmige Partikeln mit Längen von 120 nm bis 400 nm elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Aus Blattmaterial der Proben E 153 und E 552 sowie aus zwei Blattproben symptomloser Stieleichen konnten keine Viruspartikeln angereichert werden.

Am Standort NRW, FA Arnsberg traten neben erkrankten Stieleichen Buchen und Weißbuchen mit CLRV-verdächtigen Blattsymptomen auf. Aus 100 g Blattmaterial der Probe E 151 von diesem Standort gelang es mit Hilfe der Schnellreinigung für CLRV, modifiziert nach REBENSTORF (2002) (Kap. 2.2.3.1), isometrische Partikeln von etwa 25 nm und 65 nm anzureichern (Abb. 3.9). Durch die differenzielle Zentrifugation kam es zu einer Zusammenlagerung der 25 nm großen isometrischen Partikeln.

Im Anschluss an die Aufreinigungen wurden alle Überstände und aufgereinigten Präparationen auf krautige Indikatorpflanzen abgerieben (Kap. 2.1.2 und Kap. 2.2.1.1) und anschließend durch Symptombonituren und elektronenmikroskopische Untersuchungen geprüft, ob die Erreger übertragen werden konnten. Durch mechanische Inokulation gelang es nur, die stäbchenförmigen Viruspartikeln der Proben E 151 und E 152 zu übertragen (vgl. Kap. 3.4.3).

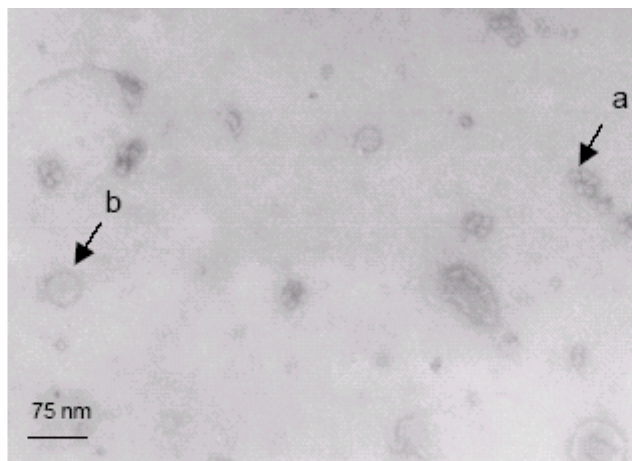


Abb. 3.9 Elektronenmikroskopische Darstellung von isometrischen Partikeln aus dem teilgereinigten Eichenblatthomogenat E 151 (Reinigung modifiziert nach REBENSTORF, 2002).

a) zusammengelagerte isometrische Partikeln von ca. 25 nm

b) isometrisches Partikel ca. 65 nm

Vergrößerung: 40.000 x

Nachweis bekannter Viren in einer RT-PCR

Isometrische Viruspartikeln, die in geringer Konzentration in elektronenoptischen Untersuchungen erkrankter Stieleichen nachgewiesen und mit Hilfe von zwei Aufreinigungsverfahren angereichert wurden, sollten im PCR-Nachweis unter Verwendung diagnostischer Primer charakterisiert werden.

Sowohl die natürliche Vergesellschaftung von Holunder, Birken und Stieleichen mit virusverdächtigen Symptomen (Kap. 3.1), als auch die morphologischen Ähnlichkeiten der Viruspartikeln (Kap. 3.3) ließen eine Infektion der Stieleichen mit CLRVR vermuten. Mittels RT-PCR sollte daher getestet werden, ob sich die aus Stieleichenblättern mit chlorotischen Ringflecken isolierten, isometrischen Viruspartikeln diesem Virus zuordnen lassen. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Blattmaterial der Probe E 1743 und dsRNA der Probe E 878 isoliert (Kap. 2.2.6.1, Kap. 2.2.6.2) und in eine RT-PCR mit CLRVR-spezifischen Primern RW 1 und RW 2 eingesetzt. (Kap. 2.2.7). Das CLRVR-spezifische Fragment wurde nicht amplifiziert.

Stieleichen am Standort B 1 zeigten chlorotische Ringflecken. Ebereschen mit einem ähnlichen charakteristischen Symptombild traten an diesem Standort vergesellschaftet mit den erkrankten Stieleichen auf (Kap. 3.1). In diesen Gehölzen konnte ein neues Virus, das *Mountain Ash Ringspot Virus* nachgewiesen werden (BENTHACK et al., 2005). Mit Hilfe einer RT-PCR mit den spezifischen Primern 261 RP und 71 FP sollte geprüft werden, ob die

Erkrankung in den Stieleichen von demselben Erreger induziert wird. In Gesamt-RNA, isoliert aus Knospenmaterial einer Stieleiche mit chlorotischen Ringflecken (E 808), konnte das für virusinfizierte Ebereschen spezifische Fragment nicht amplifiziert werden.

3.4.2 Anreicherung viraler Nukleokapside

Im Hinblick auf das vergesellschaftete Vorkommen von erkrankten Stieleichen und Ebereschen sollte durch die Anreicherung viraler Nukleokapside getestet werden, ob sich Nukleokapside ähnlicher Größe wie in Ebereschen mit chlorotischen Ringflecken auch in Stieleichen mit diesem Symptombild anreichern lassen. Dazu wurden 30 g frisches Rindengewebe von Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken (E 1584) und als Kontrolle 50 g Blattmaterial einer symptomlosen Stieleiche (E 1724) nach KELLMANN et al. (2001) (Kap. 2.2.2) aufgereinigt. Nach der Zentrifugation des Rindenextraktes aus erkrankten Stieleichen bildeten sich im Cäsiumsulfatgradienten drei lichtbrechende Fraktionen aus (Abb. 3.10). Aus dem angereicherten Extrakt des Blattmaterials der symptomlosen Stieleiche wurden vier Fraktionen aufgetrennt. Diese Fraktionen wurden in einem 12,5 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.2.5.3). Abb. 3.11 zeigt die gelelektrophoretische Trennung nach Silberfärbung der vier Fraktionen aus symptomlosen Stieleichenblättern und der zweiten Fraktion aus Rindengewebe erkrankter Stieleichen. In der zweiten Fraktion beider Proben (Spuren 3 und 5) konnte eine Proteinbande von etwa 54 KDa detektiert werden.

In einem Adsorptionspräparat dieser Fraktion aus dem Rindengewebe der erkrankten Stieleichen ließen sich zudem elektronenoptisch isometrische Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 40 nm darstellen (Abb. 3.12).

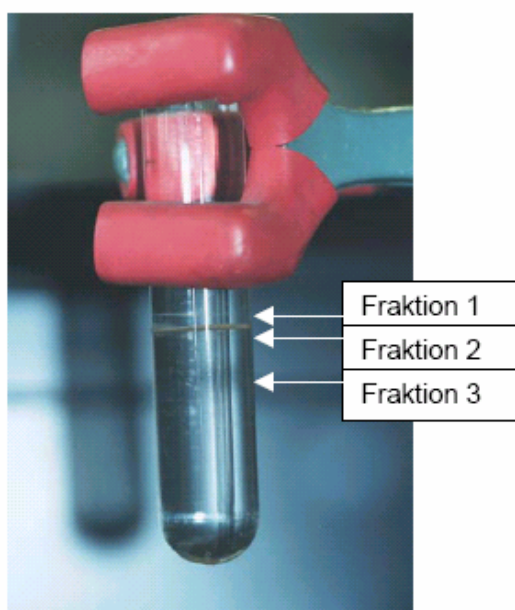


Abb. 3.10 Fraktionen angereicherter Nukleokapside aus Rindengewebe von Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken (E 1584) nach einer Cäsiumsulfatdichtegradientenzentrifugation.

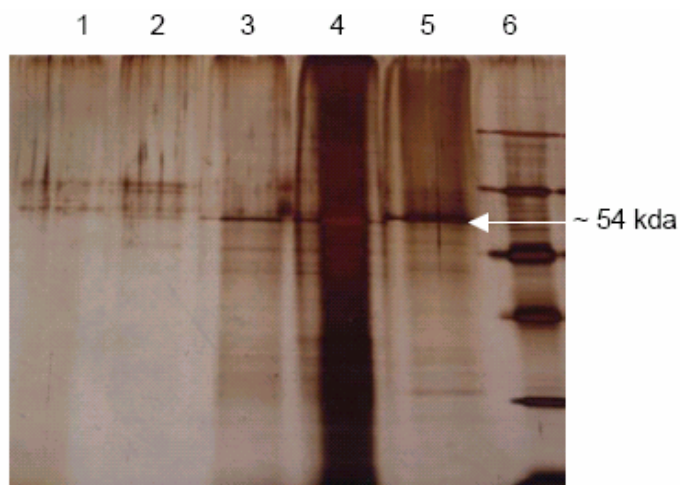


Abb. 3.11 SDS-PAGE von Proben einer Nukleokapsid-Anreicherung nach KELLMANN et al. (2001). Die angereicherten Fraktionen (Abb. 3.10) aus Blättern einer symptomlosen (1-4) und Rindengewebe einer erkrankten Stieleiche (5) wurden in einem 1,5 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und durch Silberfärbung detektiert. 1: Fraktion 4 (E 1724) 2: Fraktion 3 (E 1724) 3: Fraktion 2 (E 1724) 4: Fraktion 1 (E 1724) 5: Fraktion 2 (E 1584) 6: Proteinmarker unstained (Fa. Fermentas)

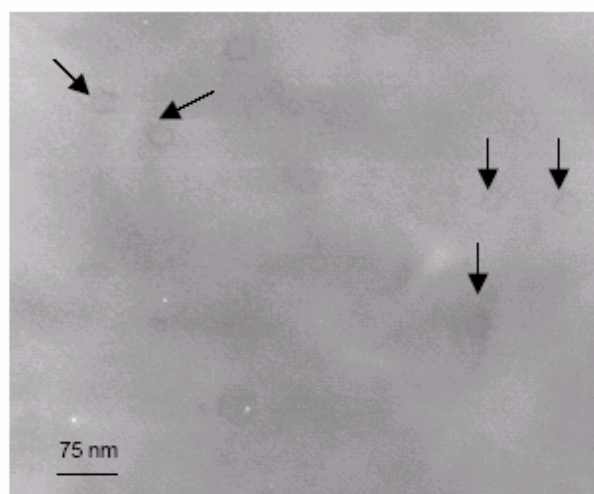


Abb. 3.12 Transmissionselektronenoptische Darstellung von isometrischen Partikeln (ca. 40 nm) in einem Adsorptionspräparat angereicherter Nukleokapside aus Rindengewebe einer infizierten Stieleiche (E 1584).

Vergrößerung: 40.000x

3.4.3 Nachweis von Tobamo-Viren in Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken

Virusreinigung

Mit HENTSCH (1998) (Kap. 2.2.3.1) gelang es, aus zwei Proben von Blattmaterial mit chlorotischen Ringflecken (E 151 und E 152) neben isometrischen, auch stäbchenförmige

Partikeln zu isolieren (Kap. 3.4.1). Diese konnten aufgrund ihrer Länge und des leicht erkennbaren Mittelkanals den Tobamoviren zugeordnet werden (Abb. 3.13).

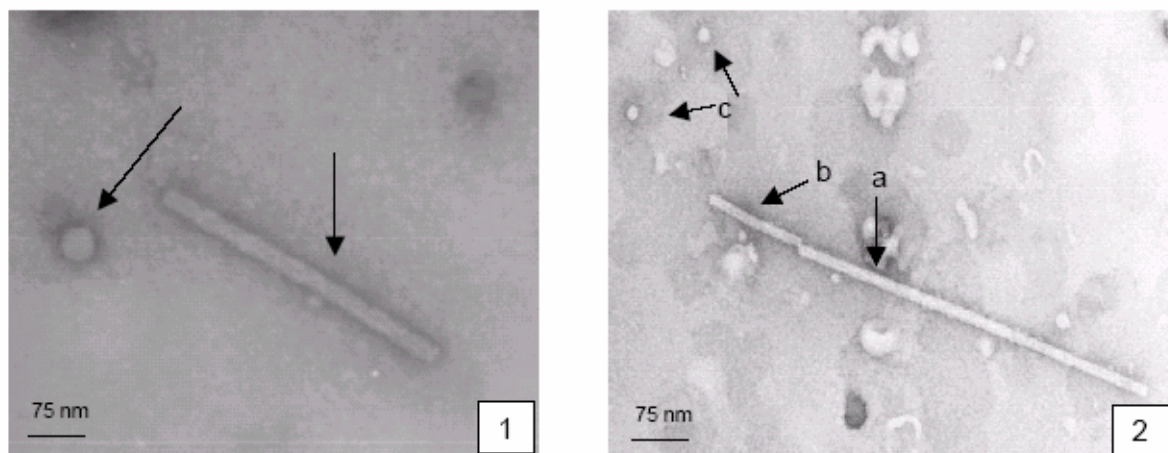


Abb. 3.13 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Adsorptionspräparaten der teilgereinigten Blatthomogenate von Stieleichenblättern mit chlorotischen Ringflecken (E 151, E 152).

- Bild 1: E 151** a) isometrisches Partikel ca. 60 nm
 b) stäbchenförmiges Partikel mit Zentralkanal ca. 350 nm
Bild 2: E 152 a) stäbchenförmiges Partikel mit Zentralkanal ca. 450 nm
 b) Bruchstück eines stäbchenförmigen Partikels mit Zentralkanal
 c) Beispiele für isometrische Partikeln, ca. 20 nm
 Vergrößerung: 40.000 x

Biotest

Zur Vermehrung der Viruspartikeln wurden die Überstände der einzelnen Zentrifugationsschritte und aufgereinigten Virussuspensionen unter Verwendung der Puffervarianten 3) und 5) auf krautige Indikatorpflanzen übertragen (Kap. 2.2.1.1). Sechs Tage nach mechanischer Übertragung der aufgereinigten Virussuspension von E 152 waren an *Nicotiana clevelandii* reproduzierbare Blattdeformationen und Wuchsdepressionen zu beobachten, die auf eine systemische Infektion hindeuteten (Abb. 3.14, Bild 1). Die gleichen Symptome konnten an *Nicotiana benthamiana* (Abb. 3.14, Bild 3) und *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' festgestellt werden. *Chenopodium quinoa*-Pflanzen zeigten chlorotische Lokalläsionen (Abb. 3.14, Bild 2). Mit der Übertragung des Agens der Probe E 151 im ersten und zweiten Überstand (Kap. 2.2.3.1) der Aufreinigung konnten reproduzierbar Chlorosen und Blattdeformationen an *Nicotiana benthamiana* induziert werden (Abb. 3.15). Die besten Übertragungsergebnisse wurden durch Inokulation mit der Puffervariante 5 (Kap. 2.2.1.1) [Phosphatpuffer versetzt mit 1,5 % (w/v) Bentonitsuspension und 2 % (w/v) Nicotin] erzielt. In Adsorptionspräparaten der infizierten Indikatorpflanzen ließen sich stäbchenförmige Viruspartikeln mit einer Länge von 350 bis 400 nm elektronenoptisch darstellen (Abb. 3.16).



Abb. 3.14 Virusverdächtige Symptome an krautigen Indikatorpflanzen inokuliert mit dem teilgereinigten Blatthomogenat einer Stieleiche mit chlorotischen Ringflecken (E 152).

Bild 1: *Nicotiana clevelandii* mit Chlorosen und Blattdeformationen an den jüngsten Blättern

Bild 2: *Chenopodium quinoa* mit chlorotischen Lokalläsionen

Bild 3: *Nicotiana benthamiana* mit Blattdeformationen und Nekrosen



Abb. 3.15 *Nicotiana benthamiana* inokuliert mit dem teilgereinigten Blatthomogenat einer Stieleiche mit chlorotischen Ringflecken (E 151).

Die Blätter zeigen Chlorosen, Nekrosen und Blattdeformationen.

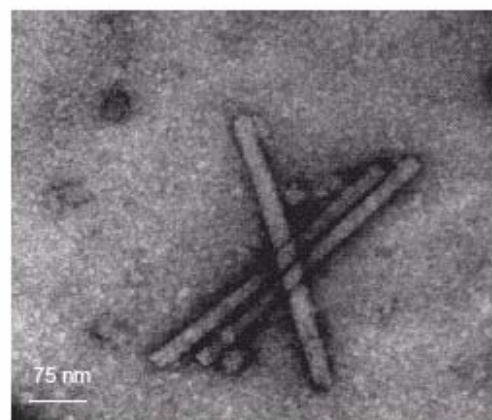


Abb. 3.16 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme stäbchenförmiger Partikeln (ca. 400 nm) aus *Nicotiana clevelandii* infiziert mit der Partikelanreicherung aus der Eichenblattprobe E 152.

Serologische Untersuchungen

Unter Verwendung von Antikörpern gegen die Tobamoviren CGMMV, ORSV, PMMoV, ToMV und TMV sollte im DAS-ELISA (Kap. 2.2.5.1) geprüft werden, welcher Spezies sich die aufgereinigten stäbchenförmigen Viruspartikeln aus infizierten Stieleichen zuordnen lassen. Für Isolatvergleiche wurden drei ToMV-Isolate aus krautigen Pflanzen (Kap. 2.3.1) vermehrt und in die serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen einbezogen. Der Presssaft aus den krautigen Indikatoren *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana tabacum* 'Samsun' und *Nicotiana clevelandii*, welche mit den Viruspräparationen E 151 und E 152 aus Stieleiche infiziert worden waren, sowie *Chenopodium quinoa*, infiziert mit den ToMV

Isolaten 05/11/1988 und 13/08/1989, reagierten in sechs Wiederholungen mit den Antikörpern gegen ToMV bzw. TMV, nicht jedoch mit den Antikörpern gegen CGMMV, BePMoV, ORSV, PMMOV.

Blatthomogenate von vier Proben aus Stieleichenblättern mit chlorotischen Ringflecken (E 130, E 146, E 149, E 151) sowie Viren vom ToMV-Isolat E 317 reagierten im ELISA-Test weder mit ToMV-noch mit TMV-Antikörpern.

Zum serologischen Vergleich wurden *Chenopodium quinoa*-Pflanzen mit den Tobamovirusisolaten E 151, E 152, E 317, 05/11/1988 sowie 13/08/1989 inokuliert und nach GOODING & HEBERT (1967) (Kap. 2.2.3.2) aufgereinigt. Aus 10 g Blattmaterial konnten so Virussuspensionen mit einer Konzentration von 170 bis 230 µg/ml bei einem Quotienten für die Reinheit von 1,2 bis 1,3, errechnet aus dem Verhältnis $\text{Absorption}_{\lambda 260} / \text{Absorption}_{\lambda 280}$ gewonnen werden. Die Suspensionen wurden nachfolgend in einen Agarosedoppeldiffusionstest (Kap. 2.2.5.2) unter Verwendung eines ToMV-Antiserums eingesetzt. Präzipitationslinien bildeten sich nur nach Einsatz des konzentrierten Antiserums mit den ToMV-Isolaten E 317, 05/11/1988 und 13/08/1989. Sie kreuzten sich nicht untereinander.

Rückübertragung auf Eichensämlinge

Jeweils fünf Eichensämlinge wurden im August 2002 durch mechanische Inokulation und mit Hilfe des 'Stem Slashing' (Kap. 2.2.1.3) mit einer konzentrierten Virussuspension der Tobamovirusisolate E 152 und 05/11/1988 infiziert. Im Untersuchungszeitraum 2002 bis 2004 konnte jedoch bei den wöchentlichen Syntombonituren im belaubten Zustand keine Symptome an den Blättern der Eichensämlinge beobachtet werden. Auch in den vier hergestellten Adsorptionspräparaten der Blatthomogenate von jeweils zwei Sämlingen wurden keine Tobamoviren nachgewiesen. Im vierfach wiederholten Biotest mit den Indikatoren *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana tabacum* 'Samsun' und *Nicotiana clevelandii* ist der positive Beweis für eine Rückübertragung der Tobamoviren auf diese fünf Eichensämlinge nicht erfolgt.

Molekularbiologischer Nachweis

Zur näheren Charakterisierung der Tobamovirusisolate wurde zunächst die IC-RT-PCR unter Verwendung von ToMV-Transportproteingen-spezifischen Primern nach JACOBI et al. (1998) (Kap. 2.2.7.2) mit Blatthomogenaten der infizierten Testpflanzen sowie den nach GOODING & HEBERT (1967) (Kap. 2.2.3.2) aufgereinigten Viruspräparationen durchgeführt. Das erwartete DNA-Fragment von 508 bp ließ sich nur in den angereicherten Tobamovirusisolaten E 151, 13/08/1989 sowie 5/11/1988 amplifizieren (Abb. 3.17; Spuren 3, 4 und 6), nicht jedoch direkt im Pflanzenhomogenat der krautigen Testpflanzen. Da dieser PCR-Nachweis nicht mit den aufgereinigten Isolaten E 317 und E 152 aus *Chenopodium quinoa*-Pflanzen gelang, wurde

für weitere Untersuchungen ein RT-PCR-Protokoll nach LETSCHERT et al. (2002) verwendet, dessen gruppenspezifische universelle Primer Tob Uni 1 und Tob Uni 2 im Hüllproteingen der Tobamoviren binden (Kap. 2.1.9). Für diesen Virusnachweis wurde Gesamt-RNA aus Blattmaterial infizierter Indikatorpflanzen, isoliert nach DELLAPORTA et al. (1983) (Kap. 2.2.6.1), eingesetzt. Nach gelelektrophoretischer Trennung der PCR-Fragmente in einem 1 %igen, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel konnte in Gesamt-RNA der Tobamovirusisolate E 152, E 317 (Abb. 3.18) sowie 5/11/1988 und 13/08/1989 eine Bande der erwartenden Größe von 804 bp visualisiert werden.

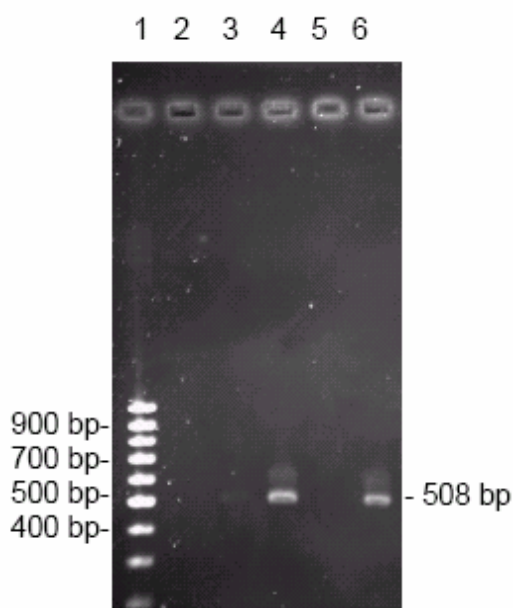


Abb. 3.17 Gelelektrophoretische Trennung der in einer RT-PCR nach JACOBI et al. (1998) mit den Primern ToMV 5 und ToMV 6 amplifizierten PCR-Produkte.

1: 50 bp DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: gesunde, Tobamovirus-freie Kontrolle (*Chenopodium quinoa*) 3: ToMV-Isolat 13/08/1989 4: ToMV Isolat 5/11/1988 5: TMV Isolat Eiche E 152 6: TMV-Isolat Eiche E 151

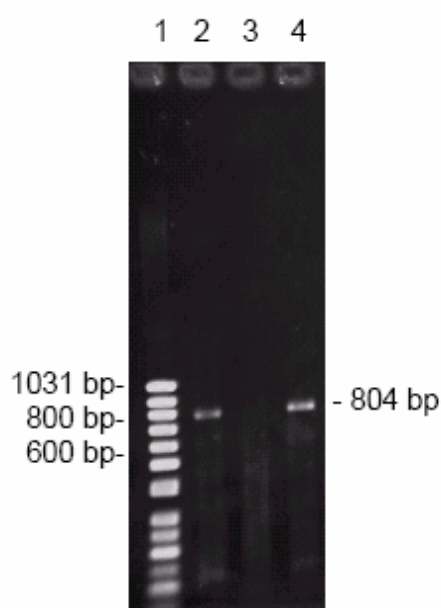


Abb. 3.18 Gelelektrophoretische Trennung der in einer RT-PCR nach LETSCHERT et al. (2002) mit den Primern Tob Uni 1 und Tob Uni 2 amplifizierten PCR-Produkte.

1: 50 bp DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: ToMV-Isolat E 317 3: gesunde, Tobamovirus-freie Kontrolle (*Chenopodium quinoa*) 4: TMV-Isolat Eiche E 152

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM®-T Easy (Fa. Promega) ligiert, in kompetenten *E. coli*-Zellen vermehrt und sequenziert. Nach einem Sequenzvergleich mit verschiedenen Sequenzen des ToMV bzw. TMV aus der Internerdatenbank NCBI ließ sich das Isolat E 152 mit einer Übereinstimmung von 97 % in 795 bp im Bereich des Hüllproteingens dem TMV *vulgare*-Stamm [Accession (Acc.) Nr.: AJ429078] zuordnen (Abb. A 2.1 im Anhang). Die Übereinstimmung zum TMV-Isolat AJ429085 betrug 72 %. Das Isolat E 151 hingegen erzielte im Sequenzvergleich des Transportproteingens mit dem ToMV-Isolat AF042032 eine Übereinstimmung von 99,8 % über 508 bp und 73 % zum TMV-Isolat AF042033. Es gehört damit zum Genus des ToMV (Abb. A 2.2 im Anhang). In einem Sequenzvergleich beider Tobamovirusisolate aus Stieleiche mit dem Gesamtgenom der

Referenzisolate ToMV X02144 und TMV X68110 konnte das Ergebnis bestätigt werden, da für E 152 Identitäten von 97 % mit TMV X68110 und 70,5 % mit ToMV X02144 und für E 151 Übereinstimmungen von 99 % zu ToMV X02144 und 72 % zu TMV X68110 ermittelt werden konnten. Die Tobamovirusisolate ToMV 5/11/1988 und ToMV 13/08/1989 konnten nach dem Sequenzabgleich eindeutig als ToMV identifiziert werden. ToMV 5/11/1988 wies eine Homologie von 98,8 % über 503 bp zum Referenzisolat ToMV X02144 auf, während ToMV 13/08/1989 zu 99,1 % in 575 bp mit diesem Isolat übereinstimmte. Das Isolat ToMV E 317 konnte ebenfalls dem TMV 'tomato strain' zugeordnet werden. Die Sequenz zeigte allerdings zu 50 % Fehlstellen ('N') auf, so dass kein Sequenzvergleich mit den anderen untersuchten ToMV-Isolaten möglich war.

Für phylogenetische Analysen wurden 25 ToMV bzw. TMV-Isolate im Bereich des Transportproteingens dem Isolat E 151 und 34 ToMV bzw. TMV-Isolate im Bereich des Hüllproteingens dem Isolat E152 gegenübergestellt. Um die beiden Isolate aus Stieleiche miteinander vergleichen zu können, wurden 15 Isolate mit bekannten Nukleinsäuresequenzen im Bereich beider Gene ausgewählt. Dazu gehören: TMV-AJ243571, ToMV-AJ132845, ToMV-AF155507, ToMV-AB083196, TMV-AJ310339, ToMV-AF332868, ToMV-X02144, TMV-Z92909, TMV-AF165190, TMV-AF546184, TMV-AF273221, TMV-AF395129, TMV-V01409, TMV-V01408, TMV-X68110.

Der auf dem Sequenzvergleich des Transportproteingens basierende Stammbaum zeigt für das Isolat E 151 die engste phylogenetische Beziehung zu dem ToMV-Isolat AF062519 sowie den TMV-Isolaten AJ310339, AJ243571 und Z92909 aus Russland. In Sequenzvergleichen stimmten die TMV-Isolate jedoch zu 99 % mit den 10 ToMV-Isolaten aus der Internetdatenbank überein und werden daher in der eigenen Arbeit ebenso der ToMV-Gruppe zugeordnet (Abb. 3.19). Für das Isolat E 152 wurde die engste phylogenetische Beziehung zum TMV-Isolat AJ429098 Hamburg-Germany ermittelt (Abb. 3.20).

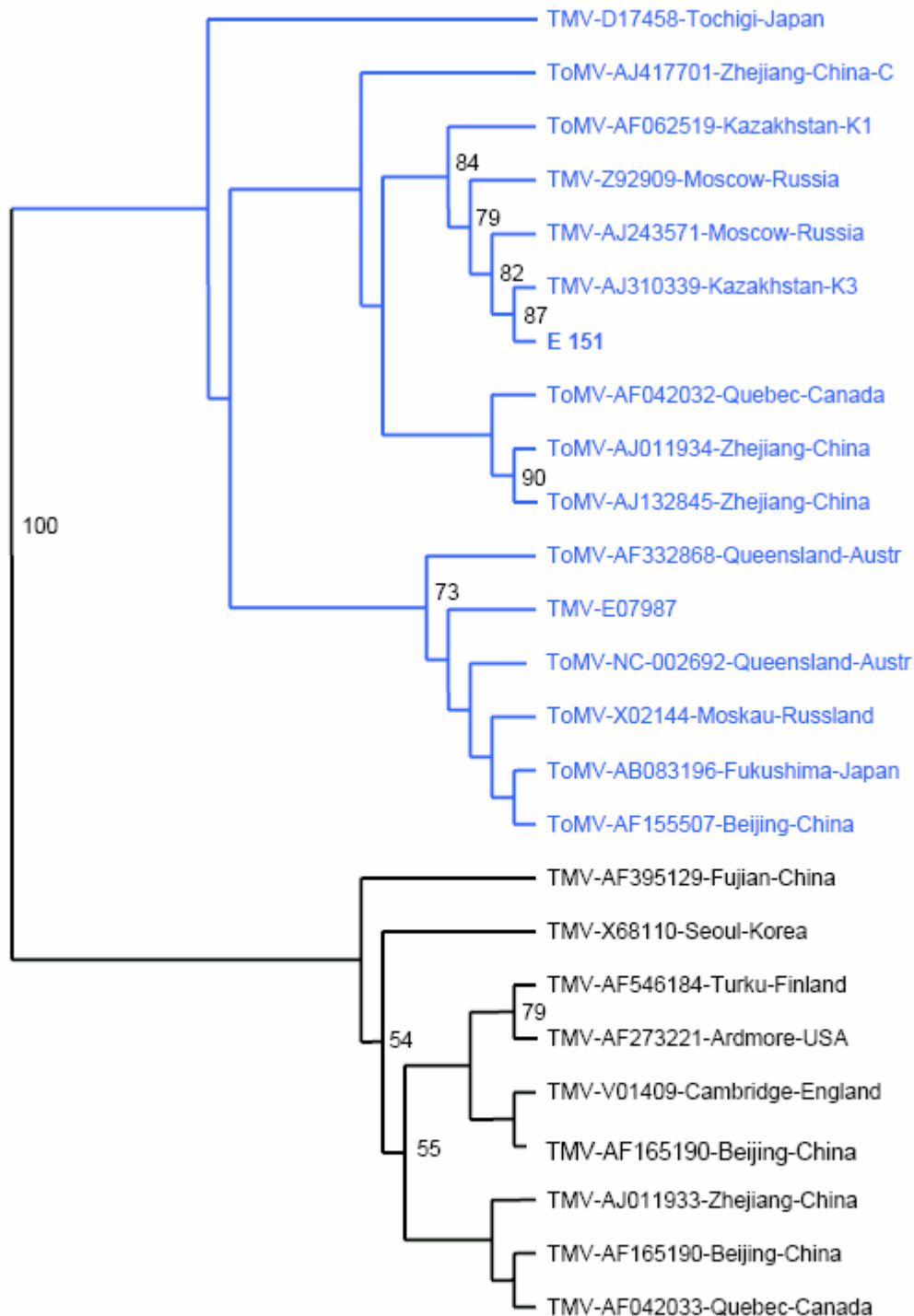


Abb. 3.19 Phylogenetische Beziehung des Isolates E 151 zu verschiedenen ToMV- und TMV-Isolaten basierend auf Nukleinsäuresequenzanalysen im Bereich des Transportproteingens. Die Gruppe der ToMV-Isolate ist blau markiert.

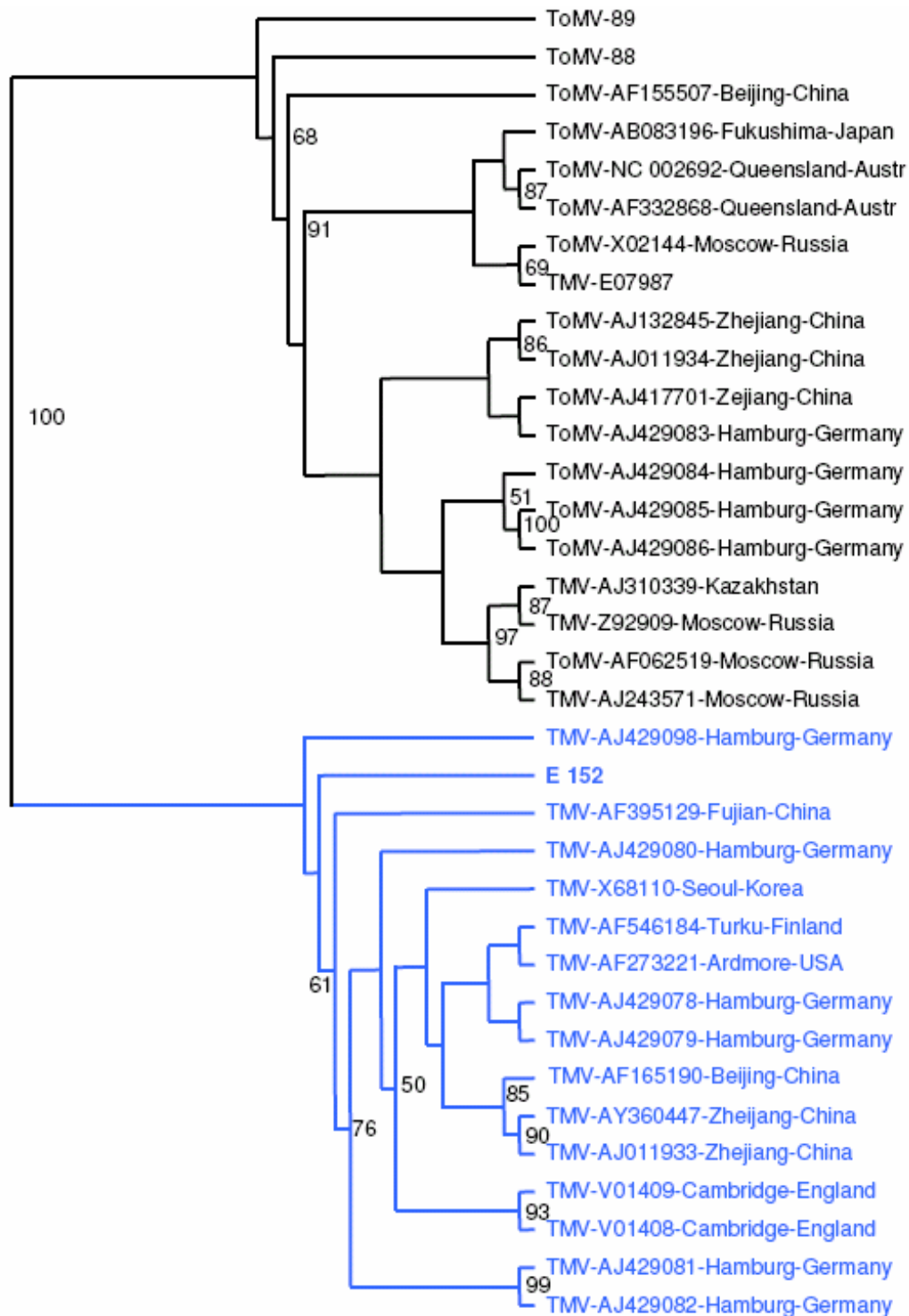


Abb. 3.20 Phylogenetische Beziehung des Isolates E 152 zu verschiedenen ToMV- und TMV-Isolaten basierend auf Nukleinsäuresequenzanalysen im Bereich des Hüllproteingens. Die Gruppe der TMV-Isolate ist blau markiert.

3.5 Nukleinsäureanalysen

3.5.1 Gesamt-RNA-und Gesamtnukleinsäure-Isolierung

Vorraussetzung für eine diagnostische RT-PCR mit erregerspezifischen Primern ist der Einsatz qualitativ hochwertiger, reiner und nicht degradierter Gesamt-RNA. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gehölzen, insbesondere aus Stieleiche, ist u. a. wegen des hohen Gehaltes an Tanninen sehr schwierig. Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Verfahren getestet, um eine geeignete Methode zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Gehölzen zu etablieren. Alle Extraktionsverfahren wurden ebenfalls mit krautigen Pflanzen getestet. Sie werden in Kap. 2.2.6.1 ausführlich beschrieben.

Im Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit (Fa. Invitex) werden zur Lyse der pflanzlichen Zellen vom Anbieter zwei unterschiedliche Puffer angeboten, die für Pflanzen mit hohem Phenol- bzw. Polysaccharidgehalt optimiert worden sind. Sekundäre Inhaltsstoffe im Probenmaterial von Stieleichen konnten jedoch mit keinem der beiden Lysepuffer entfernt werden, so dass die Säulen verstopften und eine selektive Bindung der Gesamt-RNA an das Membransystem nicht möglich war. Nach Lyse des wässrigen Pflanzenextraktes durch den Puffer RP gelang es hingegen, aus Blättern und Rinde von Holunder (*Sambucus nigra* L.) Gesamt-RNA zu isolieren. Aus Blättern krautiger Wirtspflanzen konnte unter Verwendung beider Puffer Gesamt-RNA extrahiert werden (Abb. 3.21, Spuren 3+5). Die Ausbeute an Gesamt-RNA war sowohl aus den krautigen Pflanzen (*Chenopodium quinoa*, *Nicotiana clevelandii*) als auch aus Holunder geringer als bei anderen angewendeten RNA-Extraktionsverfahren. Aus 100 mg Probenmaterial krautiger und holziger Pflanzen wurden 10-15 µg Gesamt-RNA isoliert. Der Reinheitsgrad (Quotient A 260/A 280, Kap. 2.2.6.8) der Proben lag zwischen 1,3 und 1,7 (Optimum 2,00). Banden >8 kb im Agarosegel (Abb. 3.21, Spuren 2 und 4) deuten darauf hin, dass Gesamt-RNA-Präparationen, die mit dem Kit aufgereinigt wurden, Kontaminationen mit genomischer DNA aufwiesen.

Mit der Extraktionsmethode, modifiziert nach DELLAPORTA et al. (1983), ließ sich sowohl aus krautigen (Abb. 3.21) als auch aus holzigen Pflanzen Gesamt-RNA isolieren. Je 50 mg Frischmasse konnten 30-40 µg Gesamt-RNA extrahiert werden, was in etwa der siebenfachen Menge der RNA-Isolierung durch das Kit entsprach. In krautigen und holzigen Pflanzen konnte ein Reinheitsgrad von 1,7 bis 1,9 erzielt werden. Die Analyse im 1 %igen Agarosegel war jedoch nicht zufriedenstellend. Distinkte Banden waren nicht zu erkennen (Abb. 3.21).

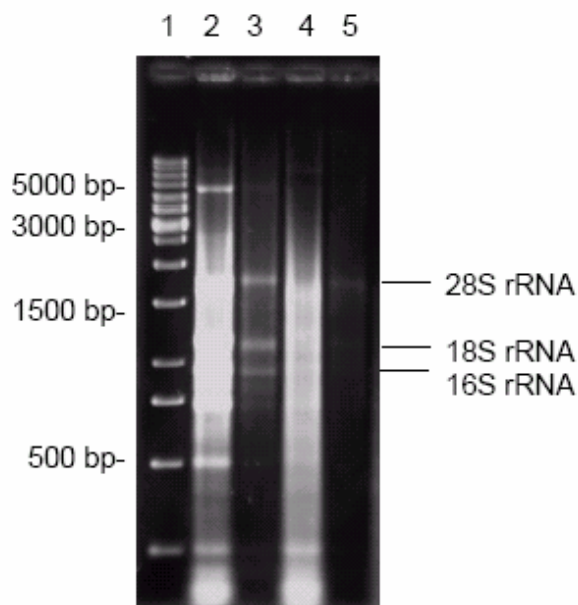


Abb. 3.21 Gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA isoliert aus Blättern von Stieleiche mit chlorotischen Ringflecken und krautigen Indikatorpflanzen unter Verwendung des Invisorb® Nukleo Spin Plant RNA Mini Kit (Fa. Invitex) sowie nach DELLAPORTA (1983) in einem nativen 1 %igen Agarosegel. Extraktion mit Invisorb® Nukleo Spin Plant RNA Mini Kit (Fa. Invitex) Spuren 3, 5 Extraktion nach DELLAPORTA et al. (1983) Spuren 2, 4: 1: 1 kb DNA-Marker (Fa. Fermentas); 2, 3: ToMV infizierte *Chenopodium quinoa*; 4,5: *Nicotiana clevelandii* infiziert mit E 152 aus Stieleiche mit chlorotischen Ringflecken

Unter Verwendung von Silica-Partikeln bei der Isolierung von Nukleinsäuren, modifiziert nach BOOM et al. (1990), konnte sowohl aus Rinde, Knospen und Blättern von Eichen, als auch aus fünf weiteren Gehölzen (Birke, Ulme, Ahorn, Holunder, Eberesche) qualitativ hochwertige und reine Gesamt-RNA erhalten werden (Abb. 3.22 und Abb. 3.23). Der hohe Reinheitsgrad der Proben bestätigte sich in einem errechneten Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm von 1,8 bis 2,0. Aus Blättern von krautigen Pflanzen konnte mit diesem Verfahren eine Ausbeute von ca. 60 µg Gesamt-RNA je 100 mg Frischmasse erzielt werden. Aus 100 mg Blatt- bzw. Rindengewebe von Stieleichen konnten etwa 20-40 µg und aus Knospenmaterial der gleichen Menge etwa 60 µg Gesamt-RNA extrahiert werden. Genomische DNA-Banden >10 kb zeigten sich nach Auftrennung der Proben im Agarosegel (Abb. 3.23, Spuren 8-11).

Mit dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass die Menge an isolierter Gesamt-RNA aus Blattmaterial holziger Pflanzen, extrahiert nach BOOM et al. (1990), etwa doppelt so hoch ist wie bei der RNA-Extraktion mit dem Kit der Fa. Invitex. Die doppelte Menge an Gesamt-RNA, jedoch mit einem geringeren Reinheitsgrad, konnte mit der Methode nach DELLAPORTA et al. (1983) gewonnen werden.

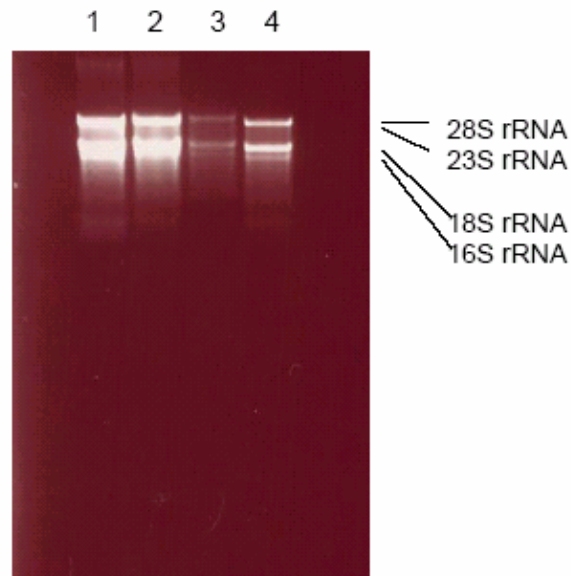


Abb. 3.22 Gelelektrophoretische Trennung von Gesamt-RNA isoliert aus Rinde und Knospen einer infizierten Stieleiche in Anlehnung an BOOM et al. (1990) in einem 1,5 %igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel. 1, 2: Knospen erkrankter Stieleiche (E 808) 3, 4: Rinde erkrankter Stieleiche (E 807)

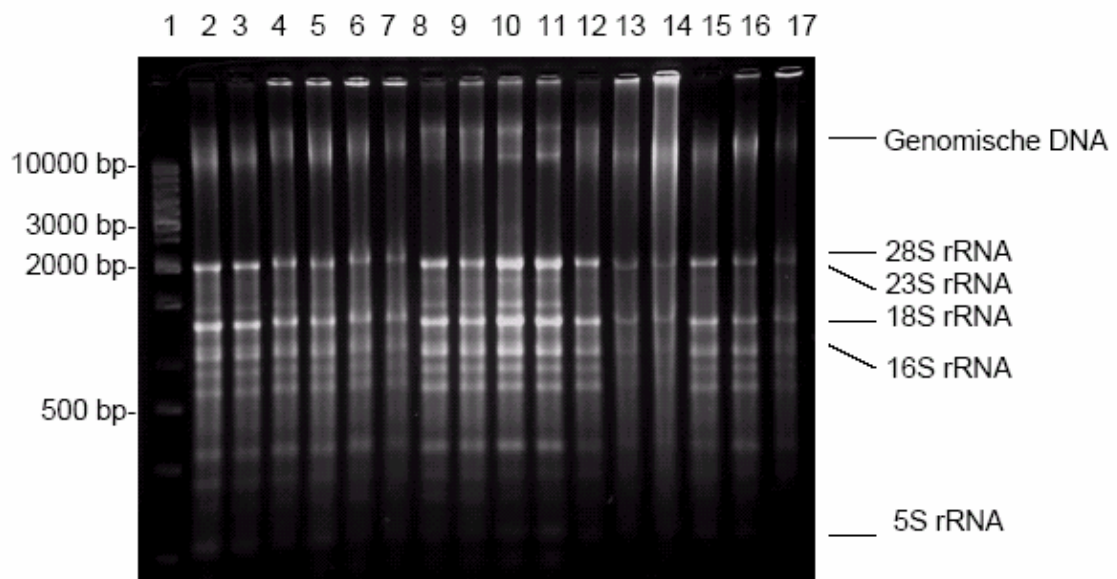


Abb. 3.23 Gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA isoliert aus Blättern von Gehölzen in Anlehnung an BOOM et al. (1990) in einem nativen 1 %igen Agarosegel. 1: 1kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2, 3: Stieleiche ohne Symptome (Breitenbachplatz 18.08.04) 4, 5: Sämling gesunder Eiche (E 342) 6-7: Stieleiche mit Ringflecken und Chlorosen (E 1782) 8, 9: Sämling erkrankter Eiche (E 338) 10, 11: Stieleiche mit Ringflecken und Nekrosen (E 1722) 12: Eberesche mit Symptomen 13, 14: Holunder mit Symptomen 15: Birke ohne Symptome 16: Ulme ohne Symptome 17: Ahorn ohne Symptome

3.5.2 Isolierung viraler Replikationsintermediate (dsRNA-Isolierungen)

Die Diagnose von Pflanzenviren kann über den Nachweis hochmolekularer dsRNA erfolgen, da über 90 % aller Pflanzenviren ein Einzelstrang (ss)-RNA-Genom besitzen und diese während der Replikation doppelsträngige Formen und Intermediate ausbilden (ZAITLIN & HULL, 1987; DODDS et al., 1984; VALVERDE et al., 1990). Für die Isolierung von dsRNA aus Stieleichen wurde das Verfahren nach BENTHACK (2001) angewendet, welches bereits für die Eberesche etabliert worden war. Durch verschiedene Modifikationen des Extraktionspuffers sollten die Schleimstoffe gebunden und entfernt, sowie deren Auswirkung auf die Qualität und Konzentration der dsRNA untersucht werden. Durch die Zugabe von Bentonit zum Extraktionspuffer und die Absenkung des pH-Wertes des Extraktions- und Waschpuffers konnten die Schleimstoffe nicht entfernt werden. Eine Vorbehandlung des Pflanzenmaterials mit Chloroform und Phenol hingegen führte zum vollständigen Abbau der Schleimstoffe und erleichterte damit die Extraktion der dsRNA. Durch große Volumina an Extraktionspuffer konnte die Viskosität der Blattextrakte reduziert und die dsRNA leichter aus der CF11-Cellulosesäule eluiert werden. In einem weiteren Versuchsansatz sollte die störende Schleimschicht quantitativ durch die Aufarbeitung geringerer Blattmaterialmengen reduziert werden. Wie Abb. 3.25 Spur 3 zeigt, konnte dadurch die Menge an isolierter dsRNA, in Abhängigkeit vom Probenmaterial, auf die Nachweisgrenze eines Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegels absinken.

DsRNA ließ sich mit Hilfe des 'Batch'-Verfahrens (CF11-Cellulose mit Waschpuffer versetzen, schütteln, abzentrifugieren des Waschpuffers) aus verstopften Cellulosesäulen eluieren. Dieses Verfahren reduzierte jedoch die Ausbeute an dsRNA um etwa 50 % (Abb. 3.24, Spur 7 und 8). In 39 von 54 dsRNA-Isolierungen nach BENTHACK (2001) konnte sowohl aus Pflanzenmaterial (Blätter, Knospen, Rinde) von Stieleichen mit virusverdächtigen Blattsymptomen, als auch aus visuell als gesund eingestuften Stieleichen dsRNA isoliert werden. Die Symptomausprägung korrelierte ebenso wenig mit der Konzentration an dsRNA. Es traten grundsätzlich bis zu zwei Doppelbanden mit Größen von etwa 1,5 kb und 1,6 kb bzw. 1,8 kb und 2,0 kb auf. Drei verschiedene Bandenmuster konnten aufgezeigt werden:

Variante 1: 1,5 kb und 1,6 kb

Variante 2: 1,8 kb und 2,0 kb

Variante 3: 1,5 kb und 1,6 kb / 1,8 kb und 2,0 kb

Das als Variante 3 bezeichnete Bandenmuster trat bei etwa 80 % aller untersuchten Extrakte auf, das der beiden anderen Varianten zu jeweils 10 %. Eine Korrelation des auftretenden Bandenmusters zum Herkunftsgebiet des Blattmaterials oder zum Zeitpunkt der Probenahme konnte nicht festgestellt werden.

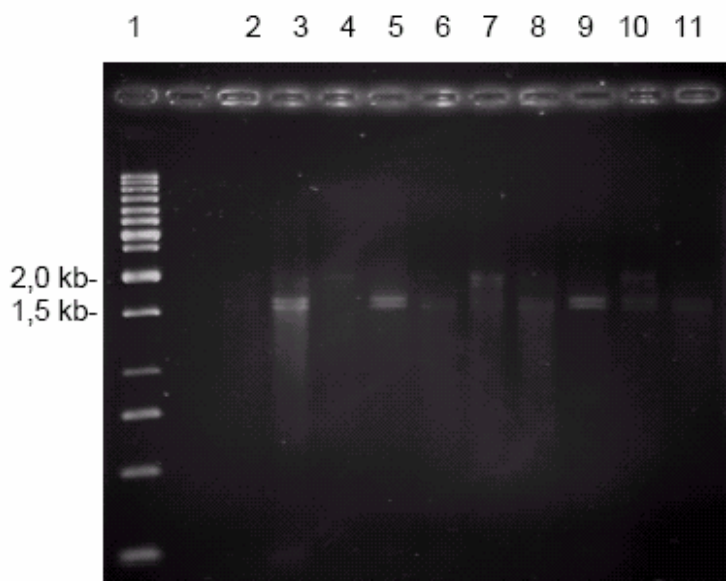


Abb. 3.24 Gelelektrophoretische Trennung von dsRNA isoliert aus 50 g Blattmaterial von Stieleichen mit und ohne Symptomen in einem nativen 1 %igen Agarosegel. Spuren 6-11 Stieleiche mit Ringflecken (E 878) mit der jeweiligen Modifikation des Protokolls:
 1: 1 kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken (E 842) 3: Stieleiche ohne Symptome (E 1163) 4: Stieleiche ohne Symptome (E 534a) 5: Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken (E 545a) 6: dsRNA-Isolierung nach Standardprotokoll von BENTHACK (2001) 7,8: Elution der dsRNA im 'Batch'-Verfahren 9: pH-Wert der Puffer 5,5 10: pH-Wert der Puffer 6,0 11: pH-Wert der Puffer 6,5

Um zu testen, ob diese charakteristischen dsRNA-Moleküle spezifisch in der Gehölzgattung *Quercus* vorkommen, wurde dsRNA aus amerikanischer Roteiche (*Quercus rubra* L.) isoliert, an deren Blättern keine virusverdächtigen Symptome zu beobachten waren. Nach elektrophoretischer Trennung und Ethidiumbromidfärbung konnte auch hier im nativen Agarosegel die Doppelbande von 1,8 kb und 2,0 kb dargestellt werden (Abb. 3.25).

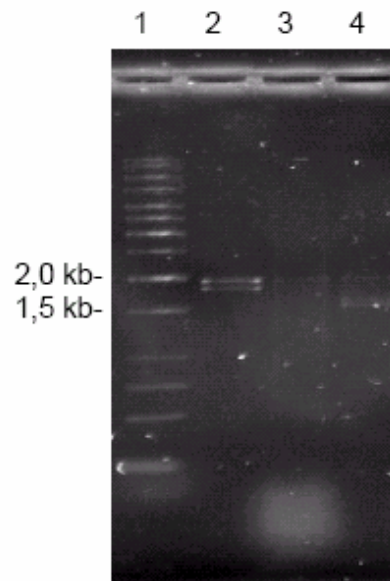


Abb. 3.25 Gelelektrophoretische Auftrennung von dsRNA isoliert aus unterschiedlichen Mengen Blattmaterial von Stieleichen mit und ohne Symptomen und einer symptomlosen Roteiche in einem nativen 1 %igen Agarosegel.

1: 1kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: amerikanische Roteiche ohne Symptome (E 828, 50 g Blattmaterial) 3: Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken (E 825, 25 g Blattmaterial) 4: Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken (E 944, 50g Blattmaterial)

dsRNA Isolierung aus Rinde und Knospen

Durch die Isolierung von dsRNA aus Rinden-und Knospengewebe einer infizierten Stieleiche (E 807, E 808) sollte geprüft werden, ob es sich bei dem Agens um einen phloemlimitierten Erreger handelt und ob sich virusspezifische dsRNA auch aus anderen Gewebeteilen isolieren lässt. Aus beiden Geweben konnten die gleichen dsRNA-Fragmente (2,0 kb -1,8 kb und 1,5 kb -1,6 kb) wie aus Blattmaterial von Stieleichen isoliert werden (Abb. 3.26, 3.27). In sehr geringer Konzentration trat im Bandenmuster der dsRNA aus Rindengewebe eine zusätzliche Bande von 3,5 kb auf (Abb. 3.26, Spur 3).

Aus 4,4 g Rindengewebe infizierter Stieleichen (E 814) konnte im Vergleich zu 50 g Blattmaterial (E 878) annähernd die fünffache Menge an dsRNA isoliert werden (Abb. 3.24 und 3.27).

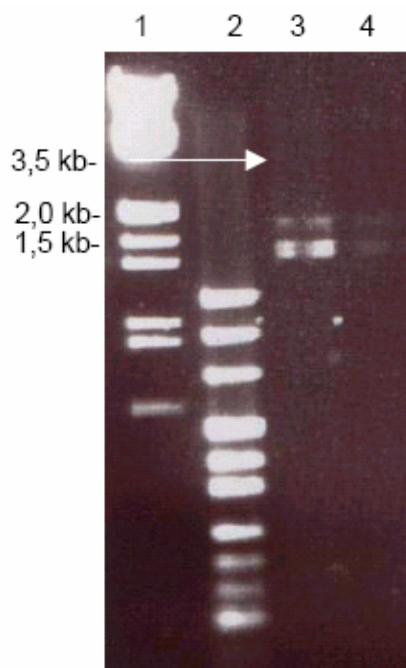


Abb. 3.26 Gelelektrophoretische Trennung von dsRNA isoliert aus Rinde und Knospen einer Stieleiche mit Ringflecken in einem nativen 1 %igen Agarosegel.

1: Lambda DNA 3-Marker 2: puc Mix 8 Marker 3: dsRNA aus 16 g Rindengewebe von Stieleichen mit Ringflecken (E 807) 4: dsRNA aus 8 g Knospen von Stieleichen mit Ringflecken (E 808)

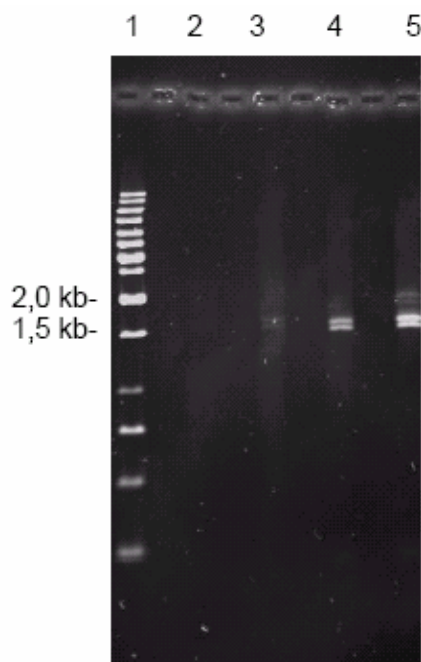


Abb. 3.27 Gelelektrophoretische Trennung von dsRNA isoliert aus Blättern und Rinde von Stieleichen mit und ohne Symptomen in einem nativen 1 %igen Agarosegel.

1: 1kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: dsRNA aus 50 g Blattmaterial von Stieleichen mit Ringflecken (E 842 a) 3: dsRNA aus 50 g Blattmaterial symptomloser Stieleichen (E 824) 4: dsRNA aus 10 g Rindengewebe von Stieleichen mit Ringflecken (E 807) 5: dsRNA aus 4,4 g Rindengewebe von Stieleichen mit Ringflecken (E 814)

Einfluss des Probenahmezeitpunktes

Für Untersuchungen zur Abhängigkeit der dsRNA-Konzentration vom jahreszeitlichen Verlauf wurden Blattproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten von Mai bis Oktober an den Standorten B 1-3 (Kap. 2.1.1; Tab. A1, Anhang 4) entnommen und für die dsRNA-Isolierung eingesetzt. Es zeigte sich, dass der Gehalt an sekundären Inhaltsstoffen im Verlauf der Vegetationsperiode abnahm, was die Isolierung von dsRNA aus Blattmaterial erleichterte. Die beiden charakteristischen Doppelbanden (2,0/1,8 kb und 1,6/1,5 kb) konnten unabhängig vom Zeitpunkt der Probenahme aus Blättern mit chlorotischen Ringflecken und symptomlosen Blattmaterial isoliert werden. Auch aus Blattmaterial, welches im Oktober entnommen wurde, konnte dsRNA extrahiert werden (Abb. 3.28). Die Konzentration der isolierten dsRNA aus den Blättern war konstant und unterlag keinen jahreszeitlichen Schwankungen.

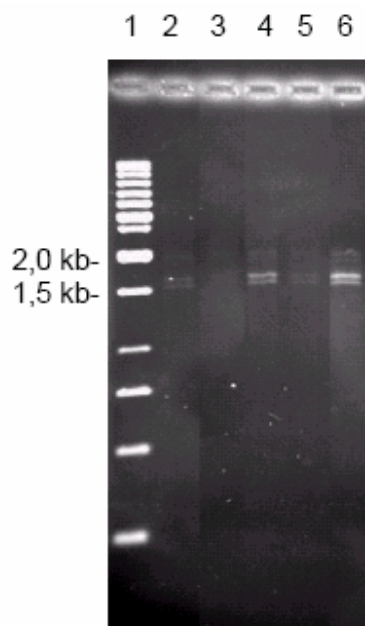


Abb. 3.28 Gelelektrophoretische Trennung von dsRNA-Fragmenten isoliert aus jeweils 50 g Blattmaterial von symptomtragenden und symptomlosen Stieleichen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden waren. Spur 2 zeigt aufgereinigte dsRNA aus infizierten Blättern, die im Juni geerntet wurden. In den Spuren 3-6 ist dsRNA aus Blättern, die im Oktober entnommen worden war aufgetrennt 1: 1kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: Mischprobe Stieleichen Ringflecken (E 878) 3: Mischprobe Stieleichen Ringflecken (E 1153/1154) 4: Stieleiche ohne Symptome (E 1159) 5: Mischprobe Stieleichen Ringflecken (E 1160) 6: Stieleiche ohne Symptome (E 1163)

Einfluss des Probenahmestandortes

Mit Hilfe der dsRNA-Isolierung aus Blättern erkrankter Stieleichen von unterschiedlicher Herkunft sollte geprüft werden, inwieweit sich die Erkrankung unter Berücksichtigung der Symptomausprägung und der Standortverhältnisse anhand des dsRNA-Musters unterscheiden lässt.

In fast allen Proben traten eine oder beide Doppelbanden von 2,0 kb und 1,8 kb sowie 1,6 kb und 1,5 kb auf. Zusätzliche dsRNA-Fragmente mit einer Größe von 5,0 kb und 1,7 kb ließen sich aus Blattmaterial einer Mischprobe erkrankter Stieleichen vom Standort NDS, RFö Hopels, Abt. 1500 A extrahieren, welche im Juni 2003 entnommen worden waren (Abb. 3.29, Spur 4). In einer Probe aus dem Folgejahr traten diese Banden nicht wieder auf.

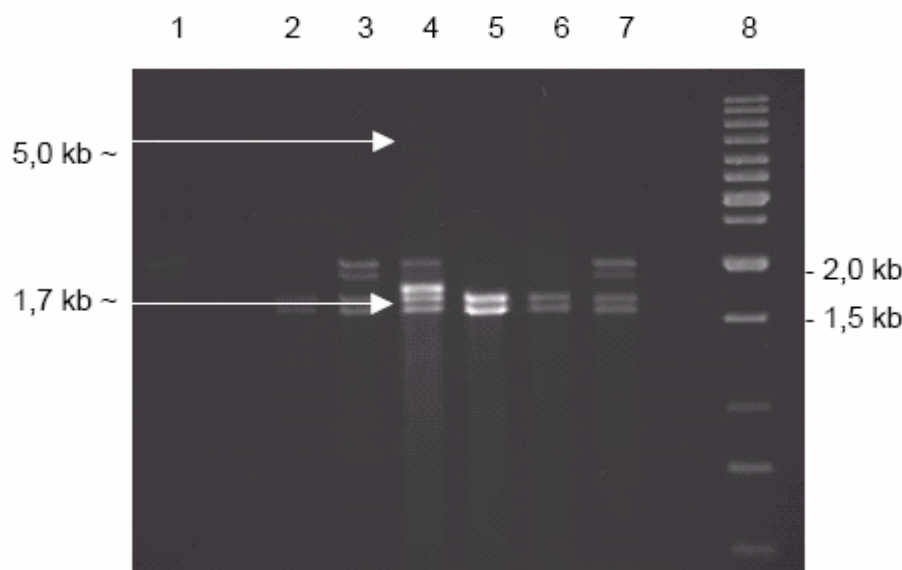


Abb. 3.29 Gelelektrophoretische Trennung von dsRNA isoliert aus jeweils 50 g Blattmaterial von symptomtragenden und symptomlosen Stieleichen von unterschiedlichen Probenahme-standorten in einem nativen 1%igen Agarosegel. 1, 2: Stieleiche Ringflecken (E 878, SN, FA Dresden-Nord) 3: Stieleiche Ringflecken (Baum A NRW, FA Arnsberg, Abt. 289 B1) 4: Stieleiche Ringflecken (E 841, NS, RFö Hopels, Abt. 1500 A) 5: Stieleiche Ringflecken (Baum 66, NRW, Hauberg (Kreuztal) 6: Stieleiche ohne Symptome (E 824, Berlin-Grunewald, Clayallee) 7: Stieleiche Ringflecken (E 1153/E 1154, Berlin 1) 8: 1 kb DNA-Marker (Fa. Fermentas)

Einfluss der Lagerdauer und Temperatur

Für die Anreicherung von dsRNA aus Stieleichen wurde geprüft, ob die Lagerdauer und -temperatur einen Einfluss auf die Ausbeute an dsRNA hatte. Dazu wurde dsRNA aus acht Eichenblattproben (E 823, E 825, E 886, E 824, E 552, E 534a, E 545a, E 1163), welche bei -20 °C bzw. -80 °C einen Tag bis 17 Monate gelagert worden waren, isoliert (Kap. 2.2.6.2, Tab. A1, Anhang 4).

Lagerdauer und -temperatur übten keinen qualitativen Einfluss auf die Extraktion der charakteristischen dsRNA-Moleküle aus. Die Doppelbanden von 2,0/1,8 kb bzw. 1,6/1,5 kb konnten aus unterschiedlich gelagertem Blattmaterial isoliert werden (Abb. 3.30).

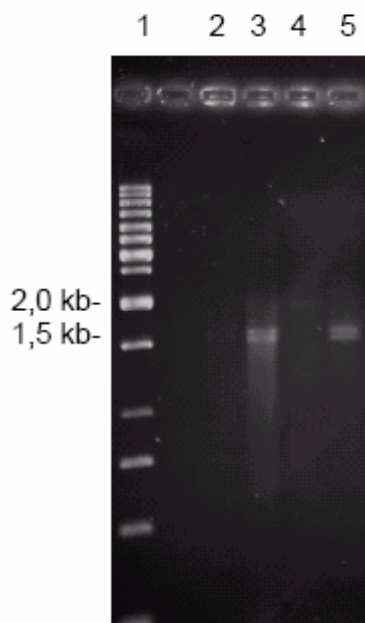


Abb. 3.30 Gelelektrophoretische Trennung von dsRNA isoliert aus jeweils 50 g Blattmaterial von symptomtragenden und symptomlosen Stieleichen, nach Lagerung bei -80°C (Spur 2, 3) bzw. -20°C (Spur 4, 5) im 1% igen Agarosegel. 1: 1 kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: Mischprobe Stieleiche Ringflecken (E 842, Lagerdauer 5 Monate) 3: Stieleiche ohne Symptome (E 1163, Lagerdauer 17 Tage) 4: Stieleiche ohne Symptome (E 534a, Lagerdauer 1,5 Jahre) 5: Mischprobe Stieleiche Ringflecken (E 545a, Lagerdauer 1,5 Jahre)

Überprüfung der Stabilität der dsRNA im RNase A-Verdau

Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass dsRNA bei einer 300 mM MgCl_2 -Konzentration nicht mit RNase A verdaut werden kann, während einzelsträngige RNA vollständig degradiert wird (BENTHACK, 2001).

Anhand eines RNase A-Verdaus bei unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen (300 mM, 100 mM, 50 mM, 0 mM) sollte die Stabilität der dsRNA überprüft werden. Dazu wurden 50 ng dsRNA mit 1,0 μl 10 $\mu\text{g/ml}$ RNase für 40 min bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der RNase A-Aktivität wurde eine Probe isolierter Gesamt-RNA aus Holunder (E 1200) bei 300 mM MgCl_2 mit RNase A (Fa. Fermentas) verdaut.

DsRNA wurde bei einer 300 mM MgCl_2 -Konzentration nicht degradiert (Abb. 3.31, Spur 1). Gesamt-RNA aus Holunder hingegen wurde bei dieser Salzkonzentration vollständig abgebaut (Abb. 3.31, Spur 6). Bei 100 mM MgCl_2 -Konzentration wurde die dsRNA durch die RNase A bereits degradiert (Abb. 3.31, Spur 3). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Verdau einzelsträngiger RNA in folgenden Untersuchungen in einer 300 mM MgCl_2 -Lösung unter Verwendung einer RNase A-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt.

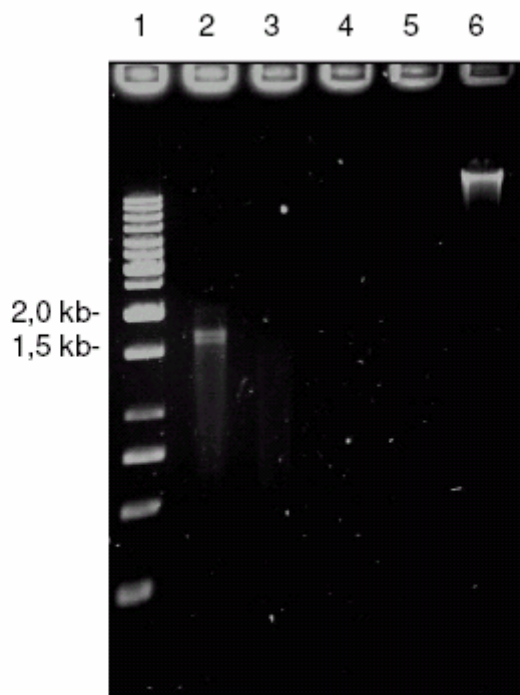


Abb. 3.31 Gelelektrophoretische Trennung des RNase A-Verdaus von dsRNA aus Stieleichen und Gesamt-RNA aus Holunder bei unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen in einem 1 %igen nativen Agarosegel. 1: 1Kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: dsRNA in 300 mM MgCl_2 3: dsRNA in 100 mM MgCl_2 4: dsRNA in 50 mM MgCl_2 5: dsRNA in 0 mM MgCl_2 6: Gesamt-RNA aus Holunder (E 1200) in 300 mM MgCl_2

3.5.3 Partielle Charakterisierung isolierter dsRNA

Zur näheren Charakterisierung der detektierten dsRNA-Moleküle wurde mit Hilfe zweier verschiedener molekularbiologischer Ansätze versucht, die Nukleinsäuresequenz der virusspezifischen dsRNA aus Stieleichen zu erhalten. Hierfür wurde die dsRNA zunächst denaturiert und mittels hexamerer Zufallsprimer und Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zur Amplifizierung der nach der Erststrangsynthese erhaltenen RNA-DNA-Hybriden wurde eine PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (DOP-PCR) durchgeführt (Kap. 2.2.9.4). Alternativ erfolgte eine "klassische" Zweitstrangsynthese modifiziert nach PROMEGA (1996) (Kap. 2.2.9.3). Für die Erststrangsynthese wurden jeweils 40-400 ng dsRNA eingesetzt.

Amplifizierung in einer DOP-PCR nach ROCHE (1999)

Die dsRNA der Proben E 931 und E 828 wurde nach Hitzedenaturierung und Sofortkühlung auf Eis mit einem hexameren Random-Primer im Gesamtansatz von 20 μl revers transkribiert (Kap. 2.2.9.1). 3 μl , 5 μl und 10 μl des cDNA-Ansatzes wurden in einer DOP-PCR mit DOP-Primer 1 in einem Reaktionsvolumen von 50 μl amplifiziert (Kap. 2.2.9.4). Ausreichende PCR-Produktmengen konnten in allen Reaktionsansätzen erst nach Reamplifizierung der DOP-PCR-Produkte in einer weiteren DOP-PCR erzielt werden. Im

Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel zeigte sich dann ein "Schmier" mit erkennbaren distinkten Banden (Abb. 3.32, Spur 4). Die Hauptproduktgröße lag bei 250 bp und 400 bp. Durch Reamplifizierung des PCR-Produktes aus dsRNA amerikanischer Roteiche konnten Banden zwischen 1120 bp und 300 bp erzeugt werden (Abb. 3.33, Spur 5).

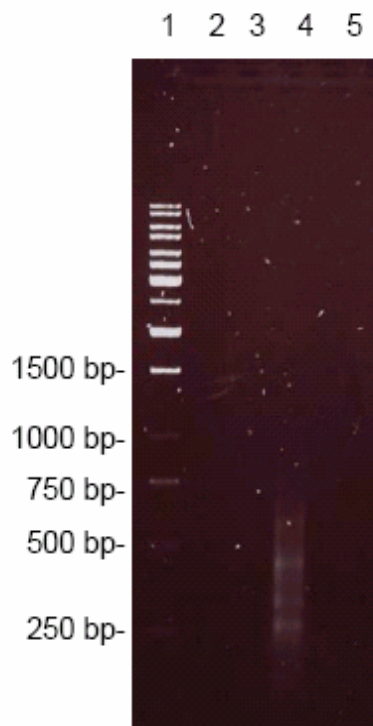


Abb. 3.32 Gelelektrophoretische Trennung der in einer modifizierten DOP-PCR mit DOP-Primer 1 erhaltenen Fragmente aus dsRNA von Stieleichen mit und ohne charakteristischen Symptomen in einem 1 %igen nativen Agarosegel. 1: 1kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: PCR-Produkte aus dsRNA der Stieleiche E 972 ohne Symptome 3: PCR-Produkte aus dsRNA der Stieleiche E 975 ohne Symptome 4: reamplifiziertes PCR-Produkt aus dsRNA von Stieleichen mit Ringfecken (E 931) 5: Wasserkontrolle

Die Verwendung von DEPC-behandeltem, destilliertem Wasser im Mastermix für die DOP-PCR bewirkte eine Anreicherung der PCR-Fragmente von 400-600 bp gegenüber der Variante mit Millipore-Wasser (Abb. 3.35).

In einer DOP-PCR mit dem DOP-Primer Bgl-Eco-RH konnten keine Fragmente amplifiziert werden.

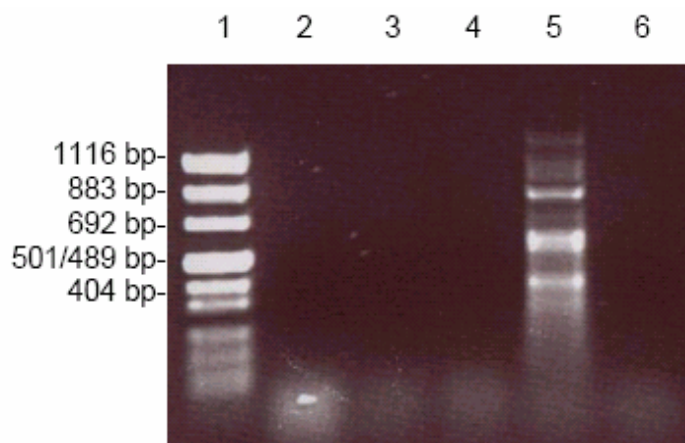


Abb. 3.33 Gelelektrophoretische Trennung reamplifizierter PCR-Produkte aus einer vorhergehenden DOP-PCR in einem 1 %igen nativen Agarosegel. 1: puc Mix 8-Marker 2: PCR-Produkte von dsRNA aus Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken (E 948) 3, 4: PCR-Produkte von dsRNA der Stieleiche E 975 ohne Symptome 5: reamplifiziertes PCR-Produkt aus dsRNA der amerikanischen Roteiche E 828 ohne Symptome 6: Wasserkontrolle

Aus dsRNA der Probe E 828 konnten sechs Klone und aus dsRNA der Probe E 931 vier Klone mit Insert selektiert werden, die mit bekannten Sequenzen der Internetdatenbanken EMBL und NCBI verglichen wurden. Aus der amplifizierten dsRNA der Probe E 931 konnte Klon 3 FE gewonnen werden, dessen Nukleinsäuresequenz über einen Bereich von 42 bp zu 100 % mit dem Hüllproteingen des *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Acc. Nr.: AF541918.1) übereinstimmte. Alle anderen Klone wiesen keine Übereinstimmungen zu bekannten viralen Erregern auf.

Modifikationen der Erststrangsynthese und DOP-PCR

Da mit dem vorangegangenen Ansatz zur Amplifikation der dsRNA-Moleküle keine eindeutigen Ergebnisse zur Identifizierung der eichenassoziierten dsRNA erzielt werden konnten, wurden zur Verhinderung einer Renaturierung oder Rückfaltung der Einzelstränge zwei dsRNA-Proben erkrankter Stieleichen (Baum A NRW, E 841) im Reaktionsvolumen von 100 µl durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert und umgehend mit flüssigem Stickstoff gefroren (Kap. 2.2.9.2). Nach Erststrangsynthese mit dem DOP-Primer Bgl-Eco-RH 2 konnten unter Einsatz von 10 µl cDNA der dsRNA-Probe (Baum A NRW, dsRNA-Fragmente 2,0/1,8 kb und 1,6/1,5 kb) im DOP-PCR-Ansatz 2 (Kap. 2.2.9.4) PCR-Fragmente amplifiziert werden. Nach Auftrennung im 1 %igen nativen Agarosegel zeigte sich ein "Bandenschmier". Das gewonnene PCR-Produkt wurde zur Konzentrierung der Nukleinsäuren gefällt und in einem Volumen von 10 µl im präparativen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.34). Die großen (2000 bp bis 1500 bp)- und kleinen PCR-Fragmente (750 bp bis 1400 bp) wurden getrennt aus dem Gel extrahiert und kloniert (Kap. 2.2.6.3 und Kap. 2.2.8). Aus den kleineren Fragmenten konnte Klon 13 gewonnen werden, dessen Sequenz nach einem Abgleich mit der

Sequenzdatenbank EMBL in 776 bp zu 64 % mit der RNA abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) des *Beet Cryptic Virus 3* (BCV 3) (Acc. Nr.: S63913, XIE et al. 1993) übereinstimmte. Der harmonisierende Sequenzbereich lag zwischen Position (Pos.) 116 und Pos. 831 der RdRp (Abb. 3.38). Der Sequenzvergleich ist im Anhang in Abb. A 3.3 dargestellt.

Die Verwendung von DEPC-behandeltem, destilliertem Wasser im Mastermix für die DOP-PCR bewirkte eine Anreicherung der PCR-Fragmente von 400-600 bp gegenüber der Variante mit Millipore-Wasser (Abb. 3.35).

In einer DOP-PCR mit dem DOP-Primer Bgl-Eco-RH konnten keine Fragmente amplifiziert werden.

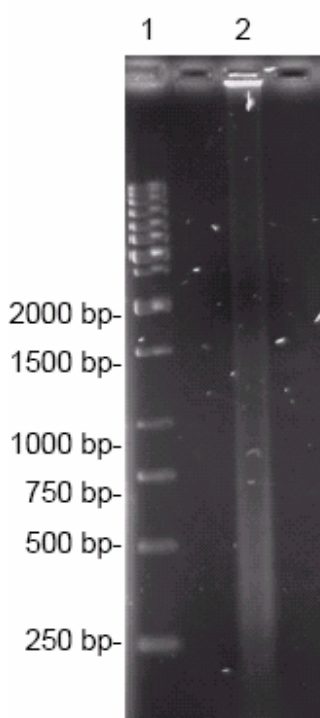


Abb. 3.34 Gelelektrophoretische Trennung von DOP-PCR-Fragmenten aufkonzentriert aus einem 100 µl-Reaktionsansatz in einem 1 %igen nativen Agarosegel.

1: 1 kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: DOP-PCR-Produkt aus dsRNA der Stieleiche Baum A NRW

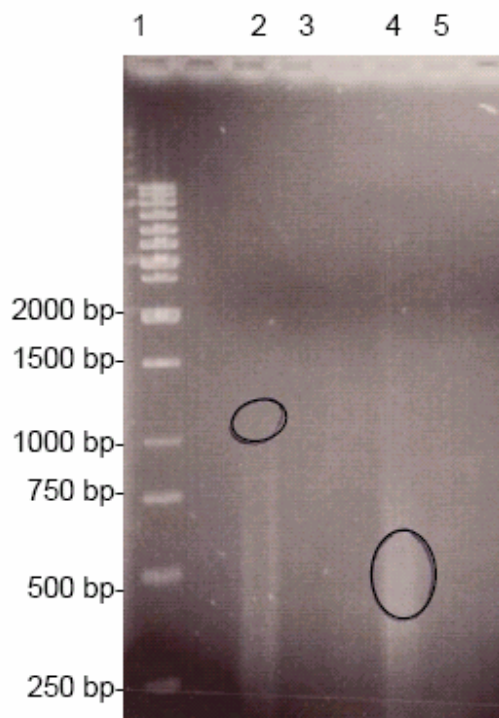


Abb. 3.35 Gelelektrophoretische Trennung von DOP-PCR-Fragmenten unter Verwendung von H_2O_{MILLI} und H_2O_{DEPC} im Mastermix in einem 1 %igen nativen Agarosegel. Spuren 2, 3 Mastermix mit H_2O_{MILLI} Spuren 4,5 Mastermix mit H_2O_{DEPC} . Markierte Bereiche wurden aus dem Gel extrahiert und kloniert.

1: 1 kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: DOP-PCR-Produkt aus dsRNA der Stieleiche Baum A NRW 3: Wasserkontrolle 4, 5: gleiche Proben wie in den Spuren 2 und 3.

Alternativ zur Hitzedenaturierung wurde die dsRNA (E 841) bei 65 °C unter Verwendung von Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) in einem Gesamtvolumen von 160 µl denaturiert. Nach einer 12-stündigen Fällung bei -80 °C wurde die denaturierte dsRNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl revers transkribiert. In einer RT-DOP-PCR (Kap. 2.2.9.4, Ansatz 2) mit 5 µl cDNA wurden PCR-Fragmente mit Größen von 300 bp-800 bp amplifiziert, die jedoch nicht kloniert werden konnten.

Zweitstrangsynthese

Die nach JELKMANN et al. (1989) erzeugten RNA-DNA-Hybriden (Kap. 2.2.9.2) aus fünf dsRNA-Proben erkrankter Stieleichen (E 545a, E 841, Baum 66, E 1154/55, E 824) und zwei Proben angereicherter Nukleokapside aus Rinde einer symptomtragenden (E 1584) bzw. Blättern einer symptomlosen Stieleiche (E 1724) wurden mit Hilfe der Enzyme RNase H und DNA-Polymerase 1 zu einer dsDNA synthetisiert. Nach einer 'Blunt End'-Klonierung der DNA-Doppelstränge wurde die Länge der Inserts über eine Amplifizierung mit vektorspezifischen Primern bzw. durch enzymatisches Schneiden des Vektors ermittelt. Die Größe der Inserts variierte zwischen 250 bp und 600 bp. (Abb. 3.36) Es zeigte sich, dass verstärkt kleinere Inserts von 50 bp und 250 bp ligiert wurden.

Durch Zweitstrangsynthese von dsRNA der Stieleiche E 545 a mit chlorotischen Ringflecken (dsRNA-Fragmente 1,6 und 1,5 kb vgl. Abb. 3.30) gelang es, einen 448 Nukleotide langen Abschnitt der dsRNA zu klonieren, dessen Sequenz nach einem Abgleich mit der Sequenzdatenbank EMBL, wie Klon 13 aus der RT-DOP-PCR, eine 61 %ige Übereinstimmung in 436 Nukleotiden mit der RdRp des BCV 3 zeigte (Abb. 3.36, Spur/Klon 12; Sequenzvergleich im Anhang Abb. A 3.2). Der entsprechende Sequenzbereich lag zwischen Pos. 1148 und Pos. 1576 der RdRp (Abb. 3.38). Mit demselben Verfahren wurde aus der dsRNA der Probe E 841 mit abweichendem dsRNA-Muster (Abb. 3.29) Klon 1 (Abb. 3.37) gewonnen, der in 355 Nukleotiden zu 67 % mit der Sequenz der RdRp des BCV 3 übereinstimmte (Sequenzvergleich im Anhang Abb. A 3.1). Die Überlappung der Sequenz lag im gleichen Bereich wie die des Klons 13, bei Pos. 253-615 (Abb. 3.38). Im Sequenzalignment der Klone 1 und 13 wurde eine Übereinstimmung von 61 % in 355 bp ermittelt (Sequenzvergleich im Anhang Abb. A 3.4).

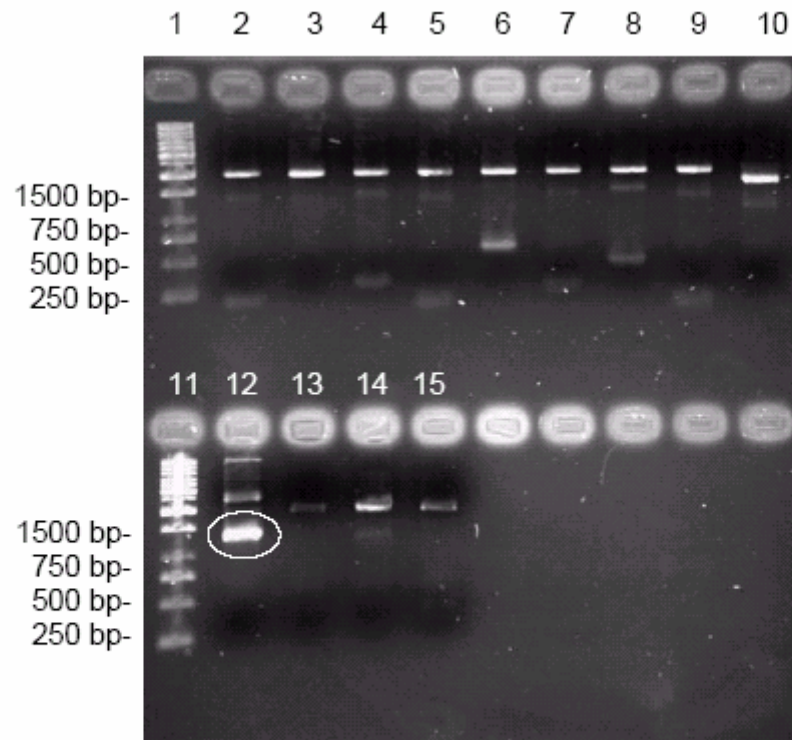


Abb. 3.36 Gelelektrophoretische Trennung eines Verdaus von pEZSEq-Plasmiden mit Inserts klonierter dsRNA mit den Restriktionsenzymen *ECO* RI und *Hind* III in einem 1 %igen nativen Agarosegel. 1, 11: 1 kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2-10, 12-15: Plasmide mit Inserts aus der cDNA-Synthese mit dsRNA der Probe 545a

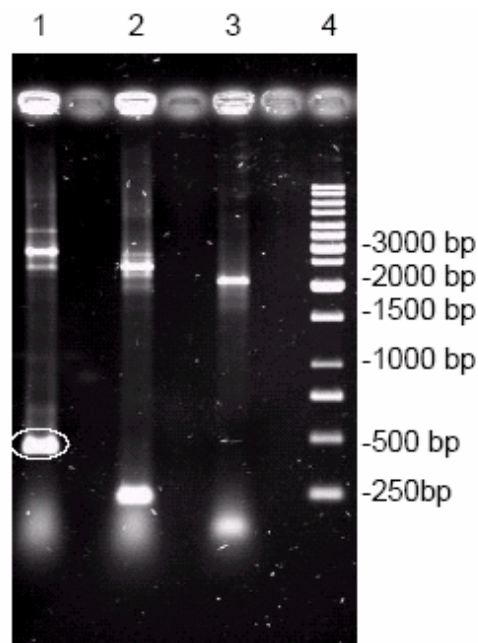


Abb. 3.37 Gelelektrophoretische Trennung von PCR-Produkten (Spur 1-3) einer Kolonie-PCR von Klonen einer Zweitstrangsynthese mit dsRNA der erkrankten Stieleiche E 841 mit vektorspezifischen M13-Primern in einem 1 %igen nativen Agarosegel. 4: 1kb DNA-Marker (Fa. Fermentas)

3.5.4 RT-PCR mit diagnostischen Primern

RT-PCR zum Nachweis der Sequenz des Klon 13 in dsRNA, Nukleokapsiden und Gesamt-RNA von Stieleichen mit und ohne Symptomen

Auf Basis der erhaltenen Sequenzinformationen konnten spezifische Primerpaare für eine diagnostische RT-PCR abgeleitet werden.

Von Klon 13, Homologien zur RdRp des BCV 3 aufzeigend, wurde das Primerpaar Oak Cryp 1 abgeleitet. Damit ließ sich sowohl in dsRNA, als auch in der zweiten Fraktion der angereicherten Nukleokapside aus Rinde von Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken (E 1584) ein Fragment von 654 bp amplifizieren (Abb. 3.39). In Gesamt-RNA erkrankter und symptomloser Stieleichen sowie in gesunden *Chenopodium quinoa*- und *Nicotiana tabacum* 'Samsun'-Kontrollpflanzen lagerten sich die Primer unspezifisch an, so dass nach gelelektrophoretischer Trennung ein Bandenmuster zu sehen war. Zur spezifischen Amplifikation des gesuchten Sequenzbereiches wurde im Anschluss eine Nested-PCR mit dem Primerpaar Oak Cryp 3 durchgeführt, welches innerhalb des ersten PCR-Produktes bindet. Die genaue Lage der Primer ist in Abb. 3.38 dargestellt. Sowohl mit dsRNA als auch mit angereicherten Nukleokapsiden und Gesamt-RNA erkrankter und symptomloser Stieleichen wurde ein 604 bp langes Fragment erzeugt (Abb. 3.40, Bild 2). Das Fragment konnte jedoch ebenso in Gesamt-RNA von *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' und *Sambucus nigra* nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob die Oligonukleotide an pflanzliche DNA binden wurde mit jeweils einer Blattprobe versucht, Gesamt-DNA aus *Chenopodium quinoa* und *Quercus robur* zu isolieren. Genomische DNA konnte mit Hilfe des NucleoSpin® Plant Kit (Fa. Macherey & Nagel) nur aus *Chenopodium quinoa* extrahiert werden (Kap. 2.2.6.4). Diese reagierte in der PCR mit anschließender Nested-PCR nicht mit den Oak Cryp 3-Primern. In einer Gesamt-Nukleinsäurepräparation von Blättern einer gesunden *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun', welche nicht mit RNase A verdaut wurde, konnte ohne Reverse Transkription, demzufolge in genomischer DNA, das Fragment von 604 bp in einer Nested-PCR mit dem Primerpaar Oak Cryp 3 amplifiziert werden. Der Vergleich der Sequenzen aus den Pflanzenarten *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun', *Sambucus nigra* und *Chenopodium quinoa* nach Klonierung und Sequenzierung zeigte, dass die Sequenzen zu 99 % mit der Sequenz der eichenassoziierten dsRNA identisch waren.

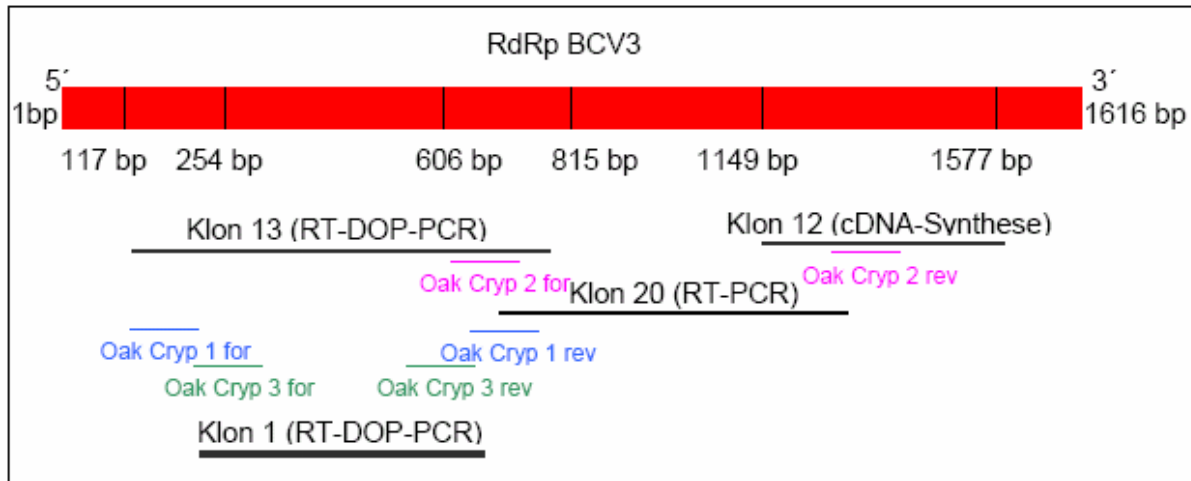


Abb. 3.38 Schematische Darstellung der RdRp des BCV 3 mit Kennzeichnung der Lage der Klone aus der RT-DOP-PCR und cDNA-Synthese sowie den daraus abgeleiteten diagnostischen Primern.

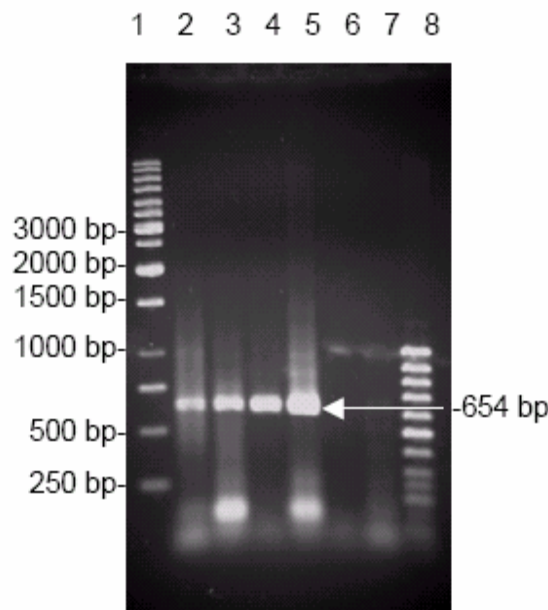


Abb. 3.39 Gelelektrophoretische Trennung von Produkten einer RT-PCR amplifiziert aus Nukleokapsiden und dsRNA von Stieleichen mit dem Primerpaar Oak Cryp 1 in einem 1 %igen nativen Agarosegel. 1: 1 kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2, 3: PCR-Produkt aus 5 µl (Spur 2) bzw. 10 µl (Spur 3) angereicherter Nukleokapside aus Blättern der Stieleiche E 1724 ohne Symptome (Fraktion 2) 4: PCR-Produkt aus 10 µl angereicherten Nukleokapsiden aus Rindengewebe der symptomtragenden Stieleiche E 1584 (Fraktion 2) 5: PCR-Produkt aus 2 µl dsRNA infizierter Stieleichen (E 1722) 6: Wasserkontrolle 7: PCR-Produkt aus 10 µl Gesamt-RNA infizierter Stieleichen (E 1743) 8: 50 bp DNA-Marker (Fa. Fermentas)

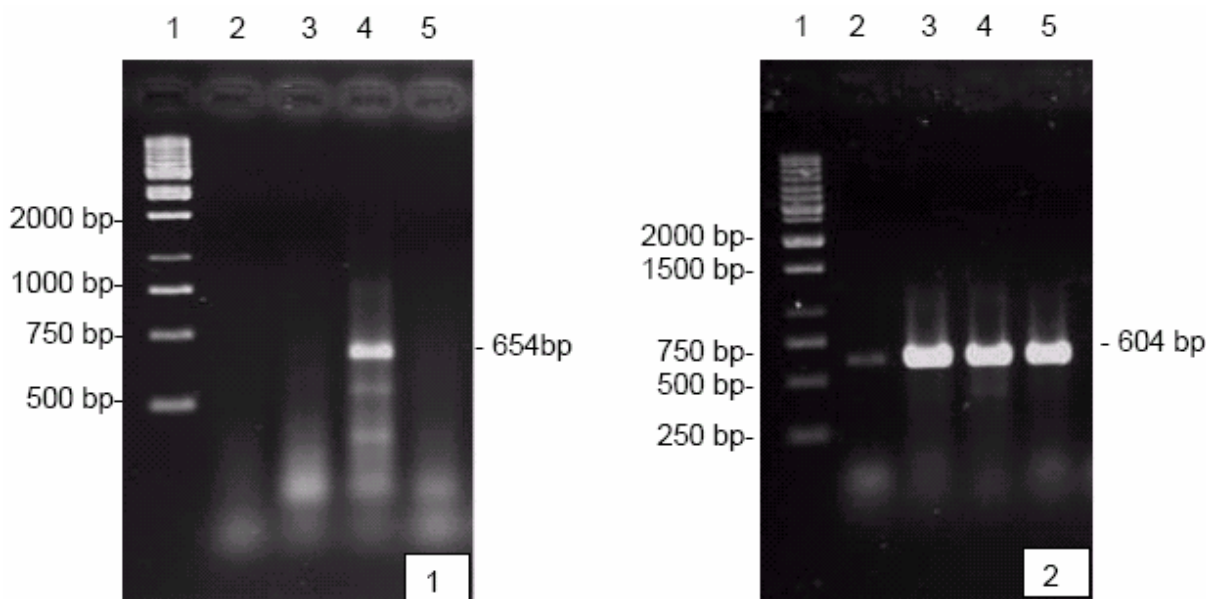


Abb. 3.40 Gelelektrophoretische Trennung von RT-PCR-Produkten amplifiziert aus Gesamt-RNA mit den Oak Cryp1-Primern in einer RT-PCR (Bild 1) und einer anschließenden Nested-PCR mit den Oak Cryp 3-Primern (Bild 2) in einem 1 %igen nativen Agarosegel.

Bild 1) 1: 1kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: PCR-Produkt des symptomlosen Stieleichensämlings E 340 (DNase 1 verdaut) 3: PCR-Produkt der Stieleichen E 1722 mit chlorotischen Ringflecken (DNase 1 verdaut) 4: PCR-Produkt einer gesunden *Chenopodium quinoa*-Pflanze (DNase 1 verdaut) 5: PCR-Produkt des symptomlosen Stieleichensämlings E 340 (unverdaut)
Bild 2) Probenauftrag siehe Bild 1.

RT-PCR zum Erhalt des Zwischenstückes der Klone 12 und 13 auf der RdRp-Sequenz des BCV 3

Klon 13 aus der RT-DOP-PCR wies die Sequenzhomologie nahe des 3'-Endes der RdRp des BCV 3 auf (Abb. 3.38). Die Übereinstimmung der Sequenz des Klons 12 aus der cDNA-Synthese war in der Richtung des 5'-Endes zu finden (Abb. 3.38). Um den fehlenden Sequenzbereich zwischen den beiden Klonen zu erhalten, wurde aus der Sequenz des Klons 12 ein 'Reverse'-Primer (Oak Cryp 2 rev) und aus der Sequenz des Klons 13 ein 'Forward'-Primer (Oak Cryp 2 for) abgeleitet (Abb. 3.38). Diese wurden in eine RT-PCR mit dsRNA und der zweiten Fraktion der angereicherten Nukleokapside aus Stieleichen eingesetzt. 500 bp-große Fragmente konnten anschließend im 1 %igen nativen Agarosegel aufgetrennt werden (Abb. 3.41), die in etwa der erwarteten Produktlänge von 532 bp aus der bekannten Sequenz der RdRp des BCV 3 entsprachen (Abb. 3.38). Sequenzdatenbankenanalysen (NCBI, EMBL) zeigten, dass das sequenzierte Zwischenstück zu 60 % mit der RdRp des BCV 3 übereinstimmte. In Gesamt-RNA von Stieleichen konnten mit diesem Primerpaar keine Fragmente erzeugt werden.

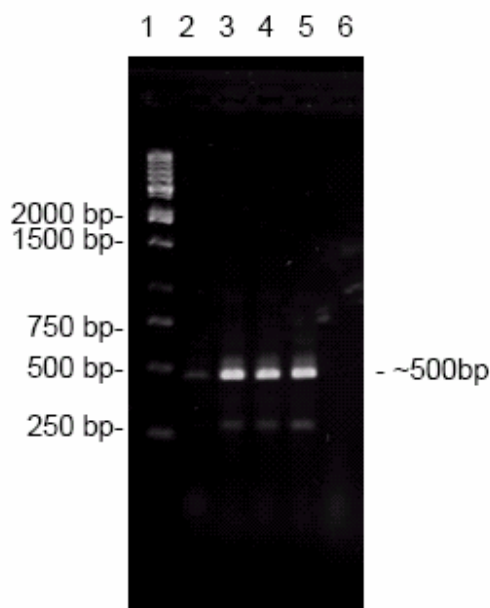


Abb. 3.41 Gelelektrophoretische Trennung von Amplifikaten einer RT-PCR mit stieleichenspezifischer dsRNA und Nukleokapsiden sowie dem Primerpaar Oak Cryp 2 zum Auffinden des Zwischenstückes von Klon 12 und 13, in einem 1 %igen nativen Agarosegel. 1: 1kb DNA-Marker (Fa. Fermentas) 2: PCR-Produkt aus angereicherten Nukleokapsiden von Stieleichenblättern ohne Symptomen (E 1724, Fraktion 2) 3: PCR-Produkt aus dsRNA der Stieleichen E 1160 mit Ringflecken 4: PCR-Produkt aus dsRNA der Stieleichen E 1722 mit Ringflecken 5: PCR-Produkt aus dsRNA der Stieleichen E 878d mit Ringflecken 6: Wasserkontrolle

3.5.5 Sequenzanalyse der klonierten dsRNA

Nach Sequenzvergleichen der RT-DOP-PCR-Produkte und cDNA-Fragmente zeigte sich, dass die drei Fragmente, die in den Klonen 12, 13 und 20 enthalten waren, überlappende Sequenzbereiche aufwiesen. Die Nukleotidsequenz wurde daher zu einem 1499 bp langen Produkt zusammengefügt, dessen Größe der Doppelbande von 1,5/1,6 kb, welche in 90 % aller dsRNA-Extraktionen unabhängig von der Symptomausprägung isoliert werden konnte, entsprach (Kap. 3.5.2). In allen dsRNA-Proben, aus denen die Klone 1, 12, 13, und 20 gewonnen wurden, konnte diese Doppelbande nachgewiesen werden (Kap. 3.5.3). Die von dieser Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte einen partiellen Leserahmen von insgesamt 479 Aminosäuren (=1437 bp) (Abb. 3.42). Das errechnete Molekulargewicht betrug 54,7 kDa. Dies entspricht in etwa der geschätzten Masse der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine aus der Nukleokapsidpräparation von Pflanzenmaterial erkrankter und symptomloser Stieleichen (Kap. 3.4.2). Mit Hilfe des BLAST-Programmes wurden verschiedene Sequenzdatenbanken (EMBL, NCBI) nach ähnlichen Sequenzen auf Aminosäureebene durchsucht. Es wurden für die 479 Aminosäuren eine Identität von 56 % zur RdRp des BCV 3 (AAB27624.1) ermittelt. Zudem wurde eine Übereinstimmung von 57 % zur Aminosäuresequenz der dsRNA 1 aus *Pyrus* (AB012616.1) gefunden. Das Molekulargewicht der beiden kodierten Proteine von 54,9 kDa ist mit dem aus *Quercus* (54,7 kDa) vergleichbar. In einem Alignment mit Hilfe des Programmes CLUSTAL W (1.82) wurden

die drei Aminosäuresequenzen miteinander verglichen (Abb. 3.43). Es zeigte sich, dass die höchsten Identitäten im Bereich von 176 bis 440 Aminosäuren auftraten.

CCGACTCGAGTTCGTCATGTGGCATTACGAGAGTATGAGTATAAGGACTTCATAACAGATCTTGAA	66
P T R V R H V A L R E Y E Y K D F I T D L E	22
GAACCTAATGAAACTCATGTTCATCGAGTCCGTAGGGAACGGGCGTTACTTATCGAGATGAATTT	132
E L N E T H V H R V R R E T G V T Y R D E F	44
GCTTTATGCGAATTGTCAGATTTGTATCCGAGATTGTATGAGCAATATCTTGAAGGATGGTCTAGA	198
A L C E L S D L Y P R L Y E Q Y L E G W S R	66
AGCTATTACACACGAGCGGACCACATGAAAGCAATCATGCAATACTCAATCCCAGAAACACCAATC	264
S Y Y T R A D H M K A I M Q Y S I P E T P I	88
GAAACTGTGAATGAACCACTGTACCAAGAGGCAATGGTTGCAGTTTTAGAAAGGTTAAGTAGCCTT	330
E T V N E P L Y Q E A M V A V L E R L S S L	110
CCACGCGTGAGGGCATTTCGACGTACTAAATCAACTTGATCTAGTGCCTTTTGAACCGTCTTCGGCG	396
P R V R A F D V L N Q L D L V P F E P S S A	132
GCAGGTTACGACTATATTGGTGCAGAAAGGCGAACTGAATGGTGAAATCATCAGCGAGCAATTCGG	462
A G Y D Y I G A K G E L N G E N H Q R A I R	154
CGAGCGAAAGCTACGCTATGGTCTGCCATTGCTCCAGACGGAGAAGGAATGGACCACGTAGTCAGG	528
R A K A T L W S A I A P D G E G M D H V V R	176
ACTGCAGTACCTGACGTCGGATACACCCGCACTCAATTAACCCAGCTTGGAGAGAAGACCAAAGTT	594
T A V P D V G Y T R T Q L T Q L G E K T K V	198
AGAGGCGTATGGGGACGAGCTTTCCATTACATCCTACTTGAAGGGACTGTTGCAGCTCCTTTGCTT	660
R G V W G R A F H Y I L L E G T V A A P L L	220
GAAGCATTTAAGCAAGGATCAACTTTCTT*TCACATTGGTCAGGTCCAACACAAAGCGTACCGAGC	725
E A F K Q G S T F X S H W S G P T Q S V P S	241
TTATTGTCAAGCACAGCTTCACAATGCGCATGGCTTATAGCGCTTGACTGGAGTGCATTGTATGCA	791
L L S S T A S Q C A W L I A L D W S A F D A	263
TCAGTCAGCAGATTTGAAATCCATGCAGCGTTTGATATCTTAGATAAGATTATAGAGTTTCCAAAC	857
S V S R F E I H A A F D I L D K I I E F P N	285
ATTGAAACATATGAATGTTACAATCTTTGCAGGCACTTATTTATCCACAAGAAGATAGCTGCGCCA	923
I E T Y E C Y N L C R H L F I H K K I A A P	307
GACGGCAAGACATATTGGTCGCACAAGGGTATACCATCCGGTAGTTATTTTACATCGGTAATCGGA	989
D G K T Y W S H K G I P S G S Y F T S V I G	329
TCTATTGTTAATAGATTACGCATCGAGTATATTGGCGAACACTCAAGGGCAGAGGACCTATTCTA	1055
S I V N R L R I E Y I W R T L K G R G P I L	351
TGTTACACTCAAGGTGATGACTCATTAATAGGTGAAACAGAATACACGAACCCAGAGAGTTTGCA	1121
C Y T Q G D D S L I G E T E Y T N P E S L A	373
GAAATAGCAAACCGCTTAAGTGGTATCTCAATCCAGCTAAGACTGAAACTTCGAGGTCAATCGAA	1187
E I A K P L N W Y L N P A K T E T S R S I E	395
TATGTGACCTTCTTAGGGAGAACATCCTATGGAGGACTGAACCAAAGAGATCTTAAACGATGTCTG	1253
Y V T F L G R T S Y G G L N Q R D L K R C L	417
AGGCTCTTAATATTCCAGAGTACCCCGTTGATTCCGGACGGATTTCAGCTTTTCGAGCGCATTC	1319
R L L I F P E Y P V D S G R I S A F F R A H S	439
ATTGCAAACGACGACGAGGAAACACCAGCGAAGTATTGAACACGATCGCAAAGCGTCTTAGACGTAAG	1385
I A N D A G N T S E V L N T I A K R L R R K	461
TACGGCATGGCTGAAGCCAATGAAGTACCTAGACAACCTTAGGCCATATATAATGTAATTATAAATG	1451
Y G M A E A N E V P R Q L R P Y I M * L * M	481
TAATTATAATTTTATTATGAGCTTAATAAAACGTCTTGACAAGCTTG	1499
* L * F S L * A * * N V L T S L	492

Abb. 3.42 Nukleotidsequenz der Klonen 13 (rot), 20 (blau) und 12 (grün) aus dsRNA von Stieleiche und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Konservierte Aminosäuresequenzmotive charakteristisch für RdRps von dsRNA-Viren sind eingerahmt.

(*) Da der Primer Oak Cryp 2 für mit der Nukleinsäuresequenz 'TCA' beginnt, die für die Aminosäure 'S' (Serin) kodiert, fehlt an dieser Stelle ein Nukleotid. In der abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde für 'TT'* ein 'X' für eine unbekannte Aminosäure geschrieben.

Die Datenbankenanalysen zeigten, dass die dsRNA aus Stieleiche sicher für eine RdRp kodiert. So wies die dsRNA-Sequenz Motive auf, wie beispielsweise das hochkonservierte GDD-Motiv, die für RdRps typisch sind (Abb. 3.42 und Abb. 3.43). Insgesamt konnten acht Sequenzmotive F(1-3) bis E in der aus dsRNA von Stieleichen erhaltenen Aminosäuresequenz eindeutig identifiziert werden (Abb. 3.44). In die Analyse der Aminosäuresequenzmotive wurden auch RdRp-kodierende Abschnitte von ssRNA- und dsRNA-Viren aufgenommen, um die Homologie der konservierten RdRp-Motive von Pflanzenviren bestimmen zu können. Ebenso wurde die RdRp-Sequenz aus Stieleiche mit RdRps, die aus Pflanzen beschrieben wurden und nicht viralen Ursprungs sind verglichen [*Nicotiana tabacum* (T30828), *Nicotiana benthamiana* (AAU21243), *Solanum tuberosum* Chromosom (AAU90307) *Oryza sativa* RNA-Replikon, Polyprotein (BAA06862), *Vicia faba* dsRNA Replikon, Polyprotein (T12117)], da RdRp-spezifische Sequenzabschnitte in einem Nested-PCR-Verfahren mit dem Primerpaar Oak Cryp 3 sowohl in symptomtragenden als auch in symptomlosen Stieleichen nachweisbar waren.

```

Quercus      PTRVRHVALREYBYKDFITDLEELNETHVHRVRRRETGVTYRDEFALCELSLDLYPRLYEQY 60
Pyrus        ---MEQNAPNGEFVVDYSEELNQNHIHKVRESNTTYVDKFAERELIDLHPEYHROF 57
BCV 3        ---MAYRNIREYEFNTNFNEELYQIEGTHNTIGRESEVILNDEFKAILIDEPFVLYEQV 57
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

Quercus      LEGWSRSYYTRADHMKAIMQYISIPETPIETVNEPLYQEQAMVAVLERLSSLPVRVAFDVLN 120
Pyrus        IQGWSRSYYNTERHMEALLNYGTRNIPVDNVDYLYQGCIDTVKNGLRSLPRVKAFDVL 117
BCV 3        CQGWSRSFYTLGHHMQAILAYAQPDTPRETFDQTIWDQAYTAVQNELSLPKARAFDVNT 117
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

Quercus      QLDLVPPFEPSSAAGYDYIGAKGELNGENHQRARRAKATLWSAIPDGEQMDHVVRTAVP 180
Pyrus        ELNLVSYKSSAAGYNMYGAKGPFDGYNHKKQAIRRARATVGDVSDNGIEGLRRAITAVP 177
BCV 3        ELDKVPYEQSSAAGYGYRSHKGPPGGETHMRAISRVPKTLMTAIRPDEEGPEYTTILESVP 177
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

Quercus      DVGYTRTQLTQLGKTKVRGVWGRAPHYILLEGTVAAPLLLEAFKQGSTFISHWSGPTQSV 240
Pyrus        DVGYTRTQLTDLTEKTKIRNVWGRAPHYILIEGTSADPLIRMFSTKTSFYHIGRDPDLSV 237
BCV 3        DIGYTRTQTLADLEKTKVRGVWGRAPHYILIEGTAARPLENFMGLTTFMHIGSDPQLSV 237
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

Quercus      PSLLSSTASQ-CAWLIALDWSAFDASVSRFEIHAAPDILDKIIIEFPNIETECYNLCRHL 299
Pyrus        PDVLSETAGK-ARWLYAIDWKQFDATVSRFEINAAFDIIMDLIEFPNYPTYVAFELSRQL 296
BCV 3        PRILHQMKREGSKWLYALDWSSEFSSVTRFEINCAFNLLKERIEFPNEETELAFELSRIL 297
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

Quercus      FIHKKIAAPDGKTYWSHKGIPSGSYFTSVIGSIIVNRLRIEYIWRITLKGKRPILCYTQGDD 359
Pyrus        FIHKKIAAPDGYIYWSHKGIPSGSYFTSIIIGSIINRLRIEYLWRKITGHGPLACYTQGDD 356
BCV 3        FKHKKLAAPDGNIMYMIHKGIPSGSYFTSIVGSVVNRLRIEYIWRVLFSPHRCYTOGDD 357
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

Quercus      SLIGETEYTNPESLAEIAKPLNWLNPAKTETSRSEYVTFGLGRTSYGGLNQDRLKRCLR 419
Pyrus        SLSCDDEFTPEKFAEIANQIGWVLNPEKTEYSTIPSEVHFLGRTMLGGLNLTREIKRCLR 416
BCV 3        SLIGETFLVEPETVAREAAKYGWIMPDKTEYSTDPGYVTFGLGRTAHGFMNARSLDKCLR 417
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

Quercus      LLIFPEYPVDSGRISAFRAHSIANDAGNTSEVLNTIAKRLRRKYGMABANEVPRQLRPYIM 480
Pyrus        LLIYPEYPVDSGRISAYRAKSISEDVGRLELLNKIERRLQGGYGIASDEEVPDYFKRYVL 477
BCV 3        LLMFPEYPVTSGRISAYRAESIARDCGGLSEVINLVARRLLRRQYGVASEDEVPHYFKRYVA 480
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
              :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

```

Abb. 3.43 Aminosäuresequenzvergleich der dsRNA-Sequenz aus *Quercus* mit der dsRNA-Sequenz aus *Pyrus* und der RdRp des BCV 3 unter Verwendung des Alignmentprogrammes CLUSTAL W (1.82). Identische Aminosäuren in allen drei Sequenzen wurden gelb unterlegt und das GDD-Sequenzmotiv eingerahmt.

		Motiv F1	Motiv F2	Motiv F3
<u>dsRNA</u>	Quercus	-LY-EQYLEGW-	-DLVPFEPSSA-	-QLTQLGEKTKVRGVWGRA-
	Pyrus	-EYHRQFIQGW-	-NLVSYK-SST-	-QLTDLTEKTKIRNVWGRA-
	Bryopsis	-RY-NITLPSD-	-QKVPFKLKSI-	-NLKPFGATTKVRQVFGVP-
	Oryza	-LWTD-TDLTD-	-RSITGRLFSV-	-DHILYVDGLRPDEISAKL-
	Vicia	-LWDD-TDLRD-	-NAVTGRLGSSV-	-KRRL-KEVLR-DEIVYTD-
Alphacrypt-	BCV3	-LY-EQVCQGW-	-DKVPYEQSSS-	-QLADLREKTKVRGVWGRA-
	WCCV 1	-LSQRKTFGEF-	-RWHHIKSGF-	-AIVKKNDPNKMRTIWGAS-
Partiti-	AhV	-LSTR-ADYFH-	-FPFRPTTDSA-	-HISKRDN-LKVRPVYNAP-
	CryptoP.	-LVPRLKYWRD-	-RTL-PKSTSA-	-QLRKRGE-NKPRLIWAYP-
	FsV	-LYGNIYGFTR-	-GQHMRDTS-	-HLSPRDD-PKTRLAWIYP-
Toti-	GAV1	-LLGRAAGPAD-	-RWAWAVNGAH-	-KLEA---G-KTRAIACD-
	SSV1	-LQGRAVQPAD-	-RWLWAVNGSQ-	-KLEH---G-KTRAIACD-
	SCSL1A	-LY---SCVRD-	-RWEVVPGGSV-	-KYEW---G-KQRAIYGTD-
Reo-	EsRV	-LE-RSML--D-	-NAGTSASSSA-	-GSREVRGGRATRIITPDP-
Rota-	BRV	-LE-EPVKHDD-	-LAGLLSMSSA-	-GRRDVPGRRTRIIFILP-
Cysto-	Phi6	-LQKFD DAYQ-	-YYVVYRAQST-	-KFVSKDRMERRRTAMVAD-
Birna-	IBDV	-LKSSSGLPYV-	-YWY-LSCGLL-	-KSTWL---TKTRNIWSAP-
	IPNV	-AKSSAGLPYI-	-FWY-LSCGLL-	-KD-WD---LKTRNIWSAP-
<u>DNA</u>	Nb	-LDGDLYFISW-	-RQTVTPMDYT-	-ALNPKCLQLATLHMAVD-
	Nt	-LDGDIYFVCW-	-RQ-VQSMGYT-	-KVKNKTPQASSIATFTRD-
	Solanum-t	-LDGDIYFVCW-	-RQ-VGPMEYP-	-KVVDKAPQASSTAI FTRD-
<u>(+) ssRNA</u>				
Tobamo-	TMV	-LSG-IIDIEN-	-VSLFSRE-SL-	-ALQITIVYHSKINAI FGPL-
Potex-	PVX	-LS--KKDIGD-	-INGTVR-QSP-	-RQAFQP---KEVFINCET-
<u>(-) ssRNA</u>				
Tospo-	TSWV	-LYYK-NNVTV-	-SKAKNVTGSV-	-VFEKMQRKTDR E IYLS-
Nairo-	DUGV	-LSGNNYDFIW-	-AILQQLAFSQ-	-KAQL---G-GSRDLLVQE-
<u>Naked RNA</u>				
Narna-	ScNV	-LSSSFEVPAD-	-RREGGFAQSI-	-VSVVRERGHKVRVVSAME-
Mito-	OV	-LRTLRSK-D-	-SNPIIYLLSA-	-LAIKEEAAGKARVFAMAD-
		Motiv A	Motiv B	
<u>dsRNA</u>	Quercus	-ALDWSAFDASVSRF-	-GIPSGSYFTSVIGSIVN-	
	Pyrus	-AIDWKQFDATVSRF-	-GIPSGSYFTSIIGSIIN-	
	Bryopsis	-CGDFSKFDSTIPPQ-	-GNVSGSFLTSALNSFVS-	
	Oryza	-ENDLTKQDRQTDKP-	-MRLTGQATTALGNCITN-	
	Vicia	-EDDLVIQDRQTDQE-	-MRLTGQATTALGNATN-	
Alphacrypt-	BCV3	-ALDWSFDSVTRF-	-GIPSGSYFTSIVGSVNN-	
	WCCV 1	-TLDWSRFDKRAYFP-	-GIPSGLFITQLLDSWYN-	
Partiti-	AhV	-LIDWSRFDHLAP-F-	-GVPSGILMTQFIDSFVN-	
	CryptoP.	-QIDFSSFDATVRTE-	-GIPSGSAFTQIIGTIVN-	
	FsV	-GLDFSSFDTKVAWL-	-GVPSGSWWTQLVDSVNN-	
Toti-	GAV1	-MLDYDDFNSHHSVL-	-TLMSGHRGTTFINSVLN-	
	SSV1	-MLDYDDFNSHHSIR-	-TLMSGRRGTTYISSVLN-	
	SCSL1A	-CYDYDDFNSQHSIA-	-TLLSGWRLTTFMNTVLN-	
Reo-	EsRV	-ALDYSTWDRQGGGR-	-AVRSGELTTQFSNHVTN-	
Rota-	BRV	-YTDVSDHDTFWPGW-	-AVASGEKQTKAANSIAN-	
Cysto-	Phi6	-ATDVSDHDTFWPGW-	-GLSSGQGATDLMGTLLM-	
Birna-	IBDV	-SIDLEKGEANCTRPQ-	-GQGSNAATFINNHLLS-	
	IPNV	-SIDLEKGEANCTRPQ-	-GQGSNAFTFLNNHLLS-	
<u>DNA</u>	Nb	-AAEMPRFLKPRE-F-	-EGVLGKLYRAIVNSSV--	
	Nt	-DYIDEAFYKSEYD-	-ILSGGIMKASKTFDRRK-	
	Solanum-t	-DYIDEAFDYKTEYD-	-ILSGGIMKT SKTFDRRK-	
<u>(+) ssRNA</u>				
Tobamo-	TMV	-ELDISKYDKSQNEF-	-QRKSGDVTTFIGNTVII-	
Potex-	PVX	-ANDYTAFDQSQDGA-	-MRLTGEGPTFDANTECN-	

(-) ssRNA			
Tospo-	TSWV	-SADQSKWSASDLTY-	-NWLQGNLNYLSSVYHSC-
Nairo-	DUGV	-SGDNTKWGPIHCCS-	-HMQGQIHHATSSLLTSM-
Naked RNA			
Narna-	ScNV	-ASDL-IPLSVASAI-	-GILMGLPTTWAILNLMH-
Mito-	OV	-LLHDVEFYSYDLSS-	-SVLFGSKFAKDWTLLV-
		Motiv C	Motiv D
dsRNA- <i>Quercus</i>		-YTQGDDSLIG-	-KTETSRSEYVTFGLRTSYGG-
Pyrus		-YTQGDDSLSC-	-KTEYSTIPSEVHFLGRTMLGG-
Bryopsis		-FILGDDFILG-	-RVADSSNQDDITFLGPNWLL-
Oryza		-LFLGDDMCMG-	-SMVVYKTDNDNVVELGPDVVRM-
Vicia		-FVLGDDNITF-	-KPQVSRNVGTFCSLCYRNSF-
Alphacrypt- BCV3		-YTQGDDSLIG-	-KTEYSTDPGYVTFGLRTAHGF-
WCCV 1		-KVQGDDSLIR-	-KSEVRNSLNGCEVLSYRNHG-
Partiti- AhV		-FIMGDDNVIF-	-KSAVTSIRRKIEVLGYTNNG-
CryptP.		-CWLGDDSLFN-	-DFEVRFPVPYVKFLGKQIDIL-
FsV		-RVLGDDSAFM-	-KSISVEDATELKLGVRYRDG-
Toti- GAV1		-LHVGDDVYFG-	-RMKQSVGHVSTEFRLNATSGR-
SSV1		-IHVGDDVYLG-	-PMKQSVGHTSTEFRLACAGR-
SCSL1A		-VHNGDDVMIS-	-PAKCNL-FSISEFLRVEHMSG-
Reo- EsRV		-NIVGDDVNVI-	-HIKQYFKMGDILLDVMLSSMT-
Rota- BRV		-RVDGDDNYAV-	-VSTVGIEKRYIAGGKIFFRAG-
Cysto- Phi6		-ISKSDDAMLG-	-GRALVGGHRLFEMLKEGKVP-
Birna- IBDV		-ERSIDDIRGK-	-LIYVPVLDKERLFCSAAYPKG-
IPNV		-ERELKNLRET-	-EMFVPVLENERLIASVAYPKG-
dsDNA - Nb		-RSNSDDLGLSL-	-YDHALLFDGYEAFIETAKNHK-
Nt		-RSDIDDMIAK-	-YNEGLKRDHFISSPWCVDYDQL-
Solanum-t		-RNDIDDMIPK-	-YNQGLKRDHFISSPWCVDYDQ-
(+) ssRNA			
Tobamo-	TMV	-AFCGDDSLLY-	-FEAKLFKKQYGYFCGRYVIHH-
Potex-	PVX	-VYAGDDSALD-	-PVITQQKGSWPEFCGWLITPK-
(-) ssRNA			
Tospo-	TSWV	-MVHSDDSTYD-	-KSFCTITLNPKKSYASSSE----
Nairo-	DUGV	-AGSSDDYAKC-	-VRRCCQMKDSAKTLVGDCF---
Naked RNA			
Narna-	ScNV	-RVCGDDLIG--	-VGPDLLRSYDRNLGLVGMIL-
Mito-	OV	-ALLGDDIVI--	-AVATSYHMIMTQILGVEINLS-

Abb. 3.44 Vergleich von acht konservierten RdRp-Motiven verschiedener Viren mit dsRNA- und ssRNA-Genom sowie von pflanzlicher RNA und DNA mit der dsRNA aus Stieleiche. Als Referenzisolate wurden die Sequenzen von BCV 3 (S63913.1) und *Pyrus* (AB012616.1) gewählt. Identische Aminosäuresequenzen orientieren sich an den Partitiviren und sind gelb markiert.

dsRNA: *Quercus*: dsRNA *Quercus*; *Pyrus*: *Pyrus pyrifolia* dsRNA (AB012616.1); *Bryopsis cinicola* (AB070653); *Oryza*: *Oryza sativa* RNA-Replikon, Polyprotein (BAA06862); *Vicia*: *Vicia faba* dsRNA-Replikon, Polyprotein (T12117); BCV 3: *Beet cryptic alphacryptovirus* 3 (S63913.1); WCCV 1: *White clover alphacryptovirus* 1 **CryptP.**: *Cryptosporidium parvum* (AAC47805); AhV: *Atkinsonella hypoxylon* 2H **Partitivirus** (NC_003470.1); FsV: *Fusarium solani partitivirus* (NC_003885.1); GAV1: *Gremmeniella abietina totivirus* RNA L1 (AAK11656); SSV1: *Sphaeropsis sapinea totivirus* RNA 2 (AF039080); SCSL1A: *Saccharomyces cerevisiae totivirus* LA L1 (M28353); BRV: *Bovine rotavirus* (P21615); EsRV: *Eriocheir sinensis reovirus* (AAT11887); Phi6: *Bacteriophage Phi 6* (1WAC_C); IBDV: *Infectious bursal disease Avibirnavirus* (P31817); IPNV: *Infectious pancreatic necrosis aquabirnavirus* (RRXSSP)

dsDNA: Nt: *Nicotian tabacum* (T30828); Nb: *Nicotiana benthamiana* (AAU21243); Solanum-t: *Solanum tuberosum* (AAU90307)

(+) ssRNA: TMV: *Tomato mosaic tobamovirus* (P03586); PVX: *Potato potexvirus X* (WMWGPV)

(-) ssRNA: TSWV: *Tomato spotted wilt tospovirus* (BAA00955); DUGV: *Dugbe Nairovirus* (Q66431)

Naked RNA: ScNV: *Saccharomyces cerevisiae narnavirus* 20S RNA (AF039063); OV: *Ophiostoma mitovirus* 3 a (NP_660176)

Auf Grundlage der Sequenzähnlichkeiten innerhalb der acht identifizierten RdRp-Motive wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt, der die dsRNA-Sequenz aus Stieleiche innerhalb der Mitglieder der Familie der *Partitiviridae* gruppiert, in die auch die dsRNA aus *Pyrus* und *Bryopsis* eingeordnet wurde (Abb. 3.45). Pflanzliche RdRps isoliert aus dsRNA von *Vicia* und *Oryza* zeigen ebenso eine Verwandtschaft zu den Partitiviren. Höchste Sequenzübereinstimmungen von 57 % wurden innerhalb der konservierten Motive zwischen dsRNA aus *Quercus* und *Pyrus*-dsRNA sowie der RdRp von BCV 3 gefunden. Weitere RdRps innerhalb der blau markierten Gruppe der *Partitiviridae* wiesen Homologien von 23 % (*Fusarium solani partitivirus*, *Cryptosporidium parvum partitivirus*) bis 14 % (*Atkinsonella hypoxylon 2H partitivirus*) zur dsRNA-Sequenz der Stieleiche auf (Abb. 3.45). Aminosäuresequenz-Identitäten zwischen dsRNA aus Stieleiche und Sequenzabschnitten von RdRps, die sich außerhalb der *Partitiviridae* gruppierten, betrugen zwischen 13 % (Nb-RNA) und 9 % (TSWV-Tospovirus).

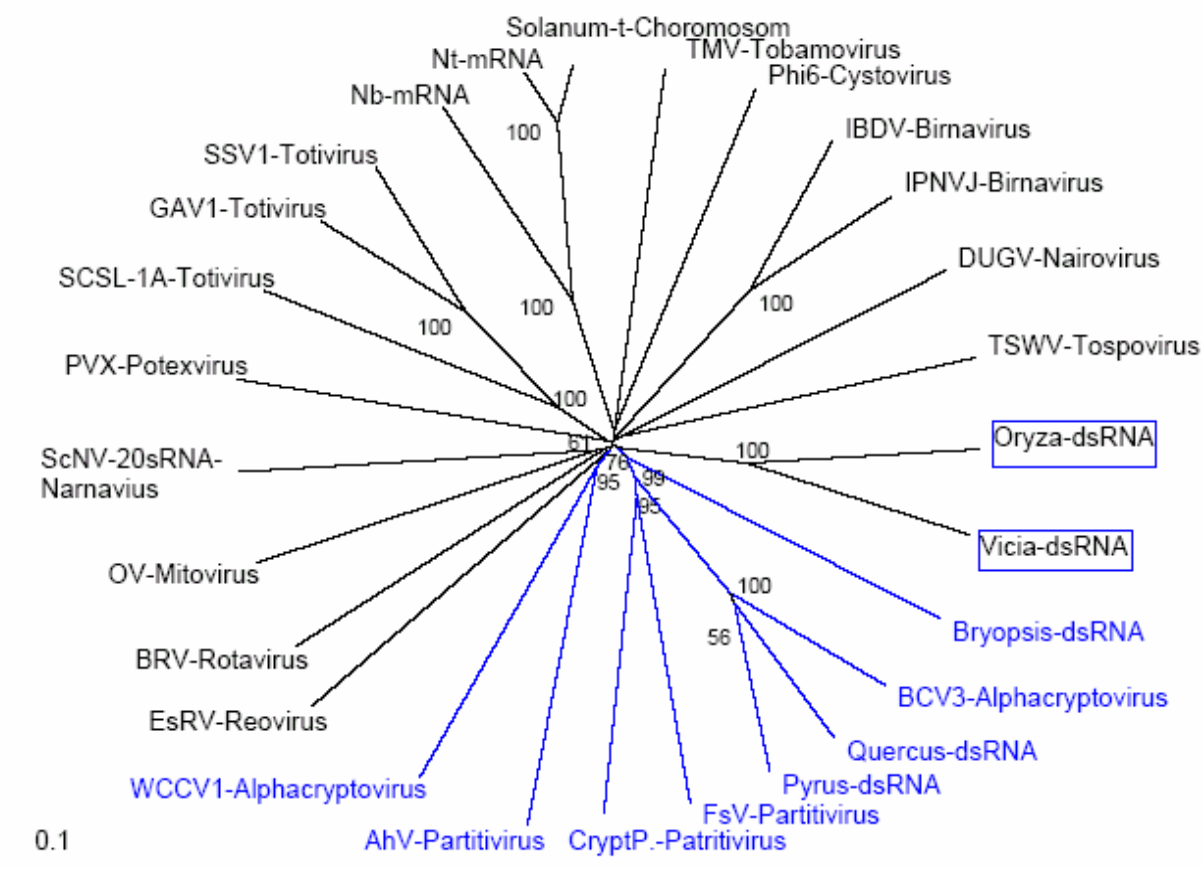


Abb. 3.45 Phylogenetische Analyse ausgewählter RdRp-Sequenzen über einen Sequenzbereich von 301 bis 381 Aminosäuren, in welchem die acht konservierten Sequenzmotive F(1-3) bis E liegen. (Referenzsequenz: RdRp BCV 3 (S63913.1) Aminosäure 53-414. Die Gruppe der *Partitiviridae* ist blau gekennzeichnet. RdRp-Sequenzen aus pflanzlicher dsRNA, die sich nahe den *Partitiviridae* gruppieren sind blau eingrahmt.

3.6 Northern-Hybridisierung

Mit Hilfe der Northern-Hybridisierung sollten die Klone aus der RT-DOP-PCR auf ihre Virusspezifität mit dsRNA aus Stieleiche getestet werden. Von Klon 13 wurde durch PCR-Amplifikation mit dem speziell aus dieser Sequenz abgeleiteten Primerpaar Oak Cryp 1 eine DIG-markierte DNA-Sonde hergestellt.

Die DNA-Sonde hybridisierte weder in der Northern-Hybridisierung (Kap. 2.2.12) noch nach direktem Spotten von denaturierter dsRNA auf die Membran (Kap. 2.2.13) mit dsRNA aus Stieleichen.

Aufgrund dessen erfolgte der spezifische Nachweis in einer RT-PCR. Dazu wurden die dsRNA-Moleküle für die genaue Zuordnung der amplifizierten dsRNA zu den dsRNA-Molekülen aus dem Agarosegel ausgeschnitten und getrennt in eine RT-PCR mit dem Primerpaar Oak Cryp 1 eingesetzt. DsRNA konnte nur mit Hilfe von Methode 2 (Kap. 2.2.6.3) aus Agarosegelen isoliert werden. Obwohl der Verlust an dsRNA durch die Gelextraktion etwa 90 % betrug, konnte das Fragment von 654 bp aus der 1400 bp und 1500 bp Bande amplifiziert werden.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde mit serologischen und molekularbiologischen Methoden die eingangs gestellte These, dass es sich bei der Ringfleckigkeit der Stieleiche um einen viralen Krankheitserreger handelt, überprüft und versucht, dieses Pathogen näher zu charakterisieren. Im Hinblick auf die Gesunderhaltung der Stieleiche mit ihrem hohen ökologischen und ökonomischen Wert ist die Kenntnis des Pathogens Grundlage zur Entwicklung erregerspezifischer Diagnoseverfahren. Diese ermöglichen einen schnellen und sicheren Nachweis in Saatgut und Baumschulmaterial und lassen damit eine Selektion auf gesundes, virusfreies Pflanzenmaterial zu. Diagnoseverfahren können darüber hinaus helfen, die Übertragungswege und Ausbreitung des Erregers im Bestand aufzuklären, sowie dessen Bedeutung in einer multifunktionalen Landschaftsnutzung abzuschätzen.

Bei der jährlichen Erfassung der Ausbreitung des Erregers in Forstabteilungen und einer Erhaltungssamenplantage im nord- und mitteldeutschen Raum wurden folgende Symptome an Stieleichen beobachtet:

- chlorotische Ringflecken, im Verlauf der Vegetationsperiode von innen her nekrotisierend
- distinkte chlorotische Läsionen
- Scheckung
- mosaikartige Blattverfärbungen

Diese Blattsymptome grenzen sich deutlich von anderen Schadbildern, verursacht durch phytopathogene Pilze, Schädlinge und abiotische Faktoren, ab. Wie BÜTTNER & FÜHRLING (1993) bereits beobachteten, ging in Einzelfällen mit den Blattsymptomen ein gestauchtes Wachstum, geringe Jahreszuwächse und ein hoher Anteil an Totholz einher (Kap. 3.1).

Chlorotische Ringflecken wurden bereits von BARNETT (1971) sowie KIM & FULTON (1973) an Schwarzeichen, von NIENHAUS (1975) an Traubeneichen und von BÜTTNER & FÜHRLING (1993) an Stieleichen beschrieben. Von mosaikartigen Blattverfärbungen an Eichenblättern berichteten BLATTNY & PROCHAZKOVA (1966), SCHMELZER et al. (1966), YARWOOD & HECHT-POINER (1970), NIENHAUS (1975) und POLÁK et al. (1990). Distinkte, chlorotische Läsionen wurden von BÜTTNER & FÜHRLING (1993) in Stieleichen nachgewiesen.

Mosaikartige Blattverfärbungen sowie chlorotische Ringflecken und Scheckungen sind Farbveränderungen, die auf eine Virusinfektion hindeuten. QUADT (1994) vermutet, dass diese durch Schädigung der Chloroplasten hervorgerufen werden, deren Ursache ein osmotisches Ungleichgewicht und der durch Virusbefall veränderte Proteinstoffwechsel sein kann. Distinkte nekrotische Läsionen können durch den programmierten Zelltod (Apoptose)

hervorgerufen werden (MITTLER et al., 1997), der durch das Kontrollgen Beclin-1 geregelt wird (LIU et al., 2005).

Die Mechanismen, durch welche ein Virus Symptome in seiner Wirtspflanze induziert, sind weitestgehend unbekannt. Fest steht, dass Interaktionen zwischen genetischen Determinanten des Virus und dem biochemisch-physiologischen System der Pflanze sowie die Expression von pflanzlichen Genen eine bedeutende Rolle spielen (ZAITLIN & HULL, 1987; YU et al., 2003, DECROOCQ et al., 2004). QUADT (1994) konnte anhand virusinfizierter Buchen ebenfalls zeigen, dass die Ausprägung der virusverdächtigen Blattsymptome auf Wechselwirkungen zwischen Wirtspflanze und Virus zurückzuführen sind.

Durch die Möglichkeit spezifische Sequenzbereiche des viralen Genoms zu modifizieren, wurden die Effekte von Genmutationen auf die Infektiosität und Pathogenität des Virus und die daraus resultierende Symptomausprägung untersucht. So zeigte sich, dass Mutationen von Genombereichen, die für die Replikation, Umhüllung und Ausbreitung des Virus in der Pflanze verantwortlich sind, die Symptomausprägung maßgeblich beeinflussen (VAN LOON, 1987; DAUBERT, 1988; DESBIEZ et al., 2003). RODRÍGUEZ-CEREZO et al. (1991) fanden durch Inokulation von *Nicotiana tabacum* mit einem modifizierten Vollängerklon von *Tobacco vein mottling potyvirus* (TVMV) bzw. dessen Wildtyps heraus, dass durch einen 58 Nukleotide langen nicht kodierenden Bereich eine Abschwächung der Symptomausprägung im Gegensatz zum Wildtyp hervorgerufen wird. Die Autoren vermuten dass Veränderungen in der Sekundärstruktur und die veränderte Sequenzabfolge die Symptomausprägung beeinflussen.

Mischinfektionen von verschiedenen Viren können synergistische Effekte auslösen. Bei Mischinfektionen mit Potyviren beispielsweise wird häufig eine Verstärkung der Virussymptome beobachtet (WANG et al., 2002). Subvirale Komponenten in den Wirtspflanzen, wie Satelliten-RNA und Viroide können ebenfalls die Symptomausprägung beeinflussen. Die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Sekundärstrukturtypen werden dafür verantwortlich gemacht (MASUTA et al., 1989; DEVIC et al., 1990).

Die äußerlich erkennbaren Schadbilder können in Abhängigkeit standortspezifischer Faktoren (z. B. Immission, Strahlung, Geländeexposition, Nährstoff- und Wasserversorgung der Böden) und deren Wechselwirkungen (BÜTTNER & FÜHRLING, 1993) variieren. Am Standort SN, FA Dresden-Nord waren im Unterschied zu den anderen Probenahmestandorten deutlich abgegrenzte, hellgelbe, distinkte Chlorosen auf den Blättern erkrankter Stieleichen zu beobachten (Kap. 3.1). Im Norddeutschen Raum konnte dieses Symptombild bisher nicht nachgewiesen werden (BÜTTNER & FÜHRLING, 1993). Der Standort in Dresden zeichnet sich durch trockene Bodenverhältnisse, bedingt durch einen niedrigen Grundwasserstand aus. Zudem liegen als Hauptbodengesellschaften im Norden der Stadt sandige Lockersedimente vor (LANDESHAUPTSTADT DRESDEN, AMT FÜR UMWELTSCHUTZ,

1995). Beste Wuchsbedingungen findet die Stieleiche jedoch auf mineralhaltigen, tiefgründigen, lehmigen bis tonigen, nicht austrocknenden Böden vor (ERLBECK et al., 2002). THOMAS et al. (2002) beschreiben einen ungünstigen Einfluss von Trockenstress, der zur Abnahme sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe führen kann und diese Baumart somit anfällig für biotische Schaderreger macht.

In Abhängigkeit des Standortes waren zudem verstärkt Infektionen mit dem echten Eichenmehltau (*Microsphaera alphitoides*) an Blättern von Stieleichen mit Symptomen zu beobachten. Für Viren ist bekannt, dass diese als prädisponierende Faktoren die Bäume anfällig für anthropogene Einflüsse und abiotische Stressfaktoren machen (BÜTTNER et al., 1993).

Die Erfüllung der Koch'schen Postulate schreibt die Vermehrung des krankheitsauslösenden Agens außerhalb des Wirtes in Nährmedien bzw. in Testpflanzen vor. Die Übertragung dient damit dem Nachweis der Pathogenität des Erregers. Anhand der Symptomausprägung auf den Indikatorpflanzen kann bereits in einigen Fällen die Zuordnung eines viralen Erregers in eine Virusgruppe erfolgen (FÜHLING, 1994). In der Diagnostik ist es üblich, mechanisch übertragbare Viren, zu denen auch die in Gewässern und Böden von Waldökosystemen vorkommenden Tobamo-, Potex- und Potyviren gehören, zunächst auf krautige Testpflanzen zu übertragen, um mit den aus diesen Pflanzen leichter zu isolierenden und vermehrenden Viren arbeiten zu können. Aufgrund von Inhibitoren wie phenolischen Verbindungen (z. B. Tannine) und der ungleichmäßigen Verteilung der Viren im Gehölz ist die Virusübertragung aus Blatthomogenaten von Laubgehölzen besonders schwierig und gelingt nur selten (FULTON, 1966; BÜTTNER et al., 1996).

In der eigenen Arbeit wurde versucht, das symptominduzierende Agens aus erkrankten Stieleichen mittels mechanischer Inokulation auf krautige Testpflanzen zu übertragen und dort zu vermehren. Zur Inaktivierung der störenden Pflanzeninhaltsstoffe und Fraktionierung der Blatthomogenate wurde die Eignung von Zusätzen wie Nikotin, EDTA, Bentonit, Na₂SO₃ und Na-DIECA zum Homogenisierungspuffer getestet. Nikotin reduziert Tannine, während EDTA als Chelatbildner die Polyphenoloxidase aktivierenden Kupferionen bindet und somit eine virusstabilisierende Wirkung erreicht (FULTON, 1966). Durch den Einsatz einer magnesiumhaltigen Bentonitsuspension sollten die Viruspartikeln von pflanzlichen Proteinen, Ribosomen und chlorophyllhaltigen Partikeln abgetrennt werden, um die Übertragung von Viruspartikeln auf krautige Pflanzen zu erleichtern (DUNN & HITCHBORN, 1965). Na₂SO₃ und Na-DIECA werden aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung zur Stabilisierung der Viruspartikeln in Verbindung mit Phosphatpuffer zur mechanischen Inokulation eingesetzt (MIJATOWIC et al., 2002). Die Untersuchungen von NIENHAUS (1975), FÜHLING (1994), BÜTTNER &

FÜHRLING (1996) sowie STEINMÖLLER et al. (2004) bestätigend, führte die mechanische Inokulation der Blatthomogenate erkrankter Stieleichen auf krautige Indikatorpflanzen unter Verwendung der beschriebenen Pufferzusätze nicht zur Symptomausprägung. Viruspartikeln konnten in Adsorptionspräparaten der inokulierten Testpflanzen ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Kap. 3.2). In noch anzustellenden Übertragungsversuchen sollten daher weitere Pufferlösungen und die Kombination von Zusatzstoffen zum Inokulationspuffer getestet werden. Ein weiteres Verfahren zur Abtrennung von Virusinhibitoren stellt z. B. die Sephadexgel- Ausschlusschromatographie dar. FÜHRLING (1994) gelang es jedoch nicht im Anschluss an die Fraktionierung von Blattpresssäften erkrankter Stieleichen über ein Gelbett (Sephadex G-100) die Erreger durch Inokulation auf krautige Indikatorpflanzen zu übertragen. Als mögliche Ursache führt die Autorin die Inaktivierung der Viren durch phenolische Inhaltsstoffe, die unter Sauerstoffeinfluss zu Quinonen oxidieren, an.

Aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung der Erreger sowie der Witterungs- und Jahreszeitbedingten Schwankung der Erregerkonzentration im Gehölz, beeinflusst die Probenentnahme das Testergebnis genauso nachhaltig, wie die Sensitivität der Methode (GARRET et al., 1985; FUCHS & GRÜNTZIG, 1994; BÜTTNER et al., 1996). Obwohl Mischproben aus unterschiedlichen Kronenbereichen zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotz der Symptomausprägung nur virusfreies Gewebe erfasst wurde. So beschreiben NIENHAUS & CASTELLO (1989) Viren in Gehölzen, deren höchste Titer in Wurzelgewebe festgestellt wurden.

Als phloemlimitierte Viren an Gehölzen sind das *Citrus tristeza virus* (CTV) in Citruspflanzen sowie das *Grapevine fleck virus* (GfKV) und *Rupestris stem pitting associated Virus-1* (RSPaV-1) in Weinreben bekannt (BRUNT et al., 1996; MENG et al., 1998; VIVES et al., 1999; SABANADZOVIC et al., 2000; MARTELLI et al., 2002). Durch Abrieb von Rindengewebe symptomtragender Stieleichen auf krautige Indikatorpflanzen wurde geprüft, ob der Erreger der Eichenringfleckigkeit möglicherweise phloemlimitiert ist oder im Leitgewebe der Rinde in höherer Konzentration vorliegt und damit aus diesem Gewebe evtl. leichter zu übertragen ist als aus Blättern. Aus Rindenstücken gelang die Übertragung des Erregers jedoch ebenfalls nicht (Kap. 3.2).

Bei der mechanischen Aufbereitung des Pflanzenmaterials können die Viruspartikeln durch das Einwirken physikalischer Kräfte beschädigt werden und ihre Infektiosität verlieren. Es wurden jedoch weder durch direktes Abreiben von Blättern mit chlorotischen Ringflecken noch durch Trockeninokulation mit Rinde erkrankter Stieleichen Symptome auf krautigen Testpflanzen erzeugt. Auch aus pulverisiertem Pflanzenmaterial konnte der Erreger nicht übertragen werden (Kap. 3.2).

Die im Biotest verwendeten Pflanzenarten haben sich für eine Vielzahl von Viren als geeignete Wirte erwiesen (FULTON, 1966). Dennoch ist es möglich, dass diese keine

Wirtspflanzen für den bisher unbekannten Erreger aus Stieleichen darstellen. In weiteren Untersuchungen zur mechanischen Übertragung des symptominduzierenden Agens müssen alternative Testpflanzen hinsichtlich ihrer Eignung als Wirte überprüft werden. Als Testpflanzen wurden *Solanaceae*, *Chenopodiaceae* und andere Pflanzenfamilien mit kurzer Lebensdauer verwendet. Möglicherweise reichte die maximal mögliche Inkubationszeit von 4-6 Wochen nicht aus, um Symptome an den Indikatorpflanzen zu erzeugen. In zukünftigen Untersuchungen sollte durch die mechanische Übertragung auf mehrjährige Kulturpflanzenarten getestet werden, ob diese als Wirte des Erregers der Ringfleckigkeit an Stieleichen geeignet sind. Ihre Langlebigkeit sichert ein Wachstum über mehrere Monate nach der Inokulation und ist daher besonders für Viren mit langen Inkubationszeiten oder langsamer Ausbreitung geeignet und darüber hinaus ein Reservoir für frisches, infiziertes Pflanzenmaterial. Dieses ist besonders für Viren erforderlich, die ihre Infektiosität durch Lagerung verlieren (ADKINS et al., 2002). Die Autoren empfehlen z. B. *Solanum bahamense* zur Vermehrung von Viren in einjährig fruktifizierenden Gehölzen wie in *Citrus*. Auch die Wirtsspezifität der Viren spielt bei der mechanischen Übertragung des Erregers eine entscheidende Rolle. Sie wird durch genetische Faktoren und die Morphologie der Pflanze beeinflusst und basiert auf Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirt (POWER & FLECKER, 2005). Für ihre Replikation sind Viren auf die Enzyme und den Syntheseparat des Wirtes angewiesen (BALTER, 1998; WISE et al., 2005). Viren mit einer geringen Spezifität besitzen einen weiten Wirtskreis, wie z. B. das *Cucumber mosaic virus* (CMV) (RYU et al., 1998). Viren mit einer hohen Spezifität hingegen weisen einen engen Wirtskreis auf, wie beispielsweise das CTV, das nur in Vertretern der *Passifloraceae* und *Rutaceae* vermehrt werden kann (DALLWITZ, 1980; DALLWITZ et al., 1993; BRUNT et al., 1996). Durch die Inaktivierung von Fremdgenen ('Gene Silencing') sind Pflanzen in der Lage, Virusinfektionen abzuwehren (SNEHASIS et al., 2004).

Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Organe der Pflanzen können die Aufnahme und optimale Vermehrung der Erreger ebenso beeinflussen. So stellten BER et al. (1990) nach künstlicher Infektion von Tomatenpflanzen mit *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) fest, dass die höchste Viruskonzentration in schnell wüchsigem Gewebe (junge Blätter, Wurzeln, Spross Apex) zu beobachten war. Sehr geringe Konzentrationen hingegen wurden in älteren Blättern und den Kotyledonen gemessen.

Es ist nicht auszuschließen, dass eine Symptomausprägung auf den Blättern der Indikatorpflanzen unter anderen Kulturbedingungen nach mechanischer Inokulation gelungen wäre. VALAT et al. (2003) untersuchten eine künstliche Infektion von Reben mit *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) durch Beschuss mit Viruspartikeln oder RNA-Extrakten und weisen darauf hin, dass die Inkubation der infizierten Reben in Dunkelheit zur Ausprägung von Symptomen beitragen kann. In noch anzustellenden Untersuchungen zur Übertragung

des symptomverursachenden Agens aus Stieleiche sollten die Indikatoren unter verschiedenen Licht- und Temperaturverhältnissen kultiviert werden.

Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass eine erfolgreiche Übertragung der Erreger mit Hilfe der mechanischen Inokulation auf Viren beschränkt ist, die auch mechanisch übertragbar sind (FÜHRLING, 1994; BÜTTNER et al., 1996). Viren, die ausschließlich über Vektoren wie Nematoden, Milben und Insekten sowie Pilze übertragen werden, können mit dieser Methode nicht erfasst werden.

Erst die Charakterisierung des Pathogens, seine Zuordnung zu einer Virusgruppe und die Entwicklung einer sicheren hochsensitiven Nachweismethode ermöglichen aufwendige Studien zur Übertragung des Erregers. Verschiedene moderne Inokulationstechniken könnten dann zur Aufklärung der Übertragungswege beitragen. Werden die virusverdächtigen Symptome durch (+)RNA-Viren hervorgerufen, wäre beispielsweise die Entwicklung eines geeigneten Modellsystems mittels *in vitro* transkribierter infektiöser Vollängen-Klone denkbar. Virale RNA und DNA kann ebenso durch Gefäßpunktierung übertragen werden. So gelang es REDINBOUGH et al. (2001) *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Foxtail mosaic virus* (FoMV) und *Maize streak virus* (MSV) ohne den Einsatz von biologischen Vektoren auf Mais zu propagieren. Bei erfolgreicher Isolierung von Viruspartikeln wäre darüber hinaus eine Infektion durch Partikelbeschuss der Pflanzen alternativ zu viralen Genomextrakten möglich (GAL-ON et al., 1995, 1997; VALAT et al., 2003). Eine andere Möglichkeit stellt die Agroinfektion dar. LEISER et al. (1992) gelang es hiermit das *Beet western yellows virus* (BWYV), welches nicht mechanisch übertragbar ist, auf krautige Testpflanzen zu übertragen.

In Nord- und Mitteldeutschland wurde eine weite Verbreitung der vermutlich durch Viren induzierten Ringfleckigkeit der Stieleichen beobachtet. Besonders auffallend war das nesterweise Auftreten der Symptome in den Stieleichenbeständen (Kap. 3.1).

Böden sind als Virusreservoir stabiler Viren zu berücksichtigen (BÜTTNER & NIENHAUS, 1989b; KEGLER, et al., 1995; FÜHRLING & BÜTTNER, 1998). In Bodenproben wurden bereits Potex- und Tobamoviren, sowie ein Isolat des *Tobacco necrosis virus* (TNV) und *Potato virus Y* (PVY) nachgewiesen (NIENHAUS, 1989). Viren können über absterbende Wurzelzellen an das Substrat abgegeben werden. Ihre Adsorption bzw. Desorption im Boden hängt von der Ionenkonzentration, dem pH-Wert, und der Zusammensetzung des organischen Materials ab. Auch die Bodenfeuchte und -temperatur können die Bindung der Viren beeinflussen (NIENHAUS & CASTELLO, 1989). Für Viren, die keine Vektoren aufweisen, ist die Übertragung durch kontaminierte Böden und Wasser von besonderer Bedeutung. Forstgehölze wie Fichten, Eschen und Eichen sind Viren im Boden extrem lange ausgesetzt, so dass eine Infektion über die Wurzelhaare stattfinden kann (FILLHART et al., 1998). Mit Hilfe des Fangpflanzenverfahrens oder der Bodenauswaschung können Viren aus Böden isoliert

werden, wobei das erstgenannte Verfahren sensitiver ist (BÜTTNER & NIENHAUS, 1989b, BÜTTNER et al., 1996; FILLHART et al., 1998). Verschiedene Virusgenera, wie beispielsweise Tobamoviren (HIRUKI & TEAKLE, 1987; FILLHART et al., 1998), Potex- und Potyviren (HIRUKI & TEAKLE, 1987, NIENHAUS, 1989), Pomoviren (SAVENKOV et al., 1999) und Necroviren (NIENHAUS, 1989) konnten bereits mit dieser Methode in Böden nachgewiesen werden. In der eigenen Arbeit wurde unter Verwendung dreier Pflanzenarten im Fangpflanzenverfahren versucht, Viren aus Böden von Stieleichenbeständen zu isolieren. An Blättern von *Chenopodium quinoa* wurden nach 14 Tagen nekrotische Lokalläsionen und chlorotische Ringflecken festgestellt (Kap. 3.2). In Adsorptionspräparaten des nekrotisierten Gewebes und in Wurzelproben ließen sich allerdings keine Viruspartikeln darstellen. FILLHART et al. (1998) konnten mit dieser Versuchstechnik nur wenige begrenzte Wurzelinfektionen an *Chenopodium quinoa* erzeugen. Dieses Ergebnis führt er auf die geringe Inokulumsdichte im Boden sowie die kurze Inkubationszeit von krautigen Pflanzen in kontaminierten Böden zurück. TUITERT & BOCHEN (1993) sowie YILMAZ et al. (2004) geben als optimale Inkubationszeit sechs Wochen für diesen Test an. In noch durchzuführenden Untersuchungen zur Übertragung des Erregers der Ringfleckigkeit in Stieleichen sollten neben weiteren Pflanzenarten auch längere Inkubationszeiten für das Fangpflanzenverfahren geprüft werden. Es ist davon auszugehen, dass das Agens der Ringfleckigkeit nicht, oder in sehr geringer Konzentration im Boden vorliegt, so dass es mit den bisher angewendeten Methoden nicht nachweisbar war. Nach Charakterisierung des Erregers wäre der spezifische Nachweis direkt aus dem Boden auf Basis einer PCR denkbar.

Viren können in Pflanzenresten im Boden überdauern. Durch Grund- und Oberflächenwasser können stabile Viren ausgewaschen und an andere Standorte transportiert werden. Der Wasserübertragbarkeit von Pflanzenviren ist daher ebenso Beachtung beizumessen, wie der Bodenübertragbarkeit (NIENHAUS & CASTELLO, 1989; BÜTTNER & NIENHAUS, 1989a; BÜTTNER et al., 1996). Ein verstärktes Auftreten erkrankter Stieleichen an Wasserläufen und moorastigen Standorten war in den eigenen Bonituren und Erhebungen nicht festzustellen. Aufgrund der heterogenen Verteilung der befallenen Bäume in den einbezogenen Forstamtsbereichen ist die vorwiegende Verbreitung des Erregers über Grund- und Oberflächenwasser als unwahrscheinlich einzustufen.

Vielmehr ist eine Saatgutübertragbarkeit des symptomverursachenden Agens aus Stieleichen anzunehmen. Darauf deutet zum einen das nesterweise Auftreten der erkrankten Stieleichen in den untersuchten Forstabteilungen hin. Zum anderen sind Viren in Gehölzen bekannt, wie beispielsweise TMV (BRUNT et al., 1996), die sich über das Saatgut im Bestand ausbreiten können. In den eigenen Untersuchungen wurde Saatgut erkrankter Stieleichen ausgesät und über einen Zeitraum von drei Jahren regelmäßig bonitiert. Schwach

chlorotische Ringflecken waren nur an den Blättern eines Sämlings erkennbar (Kap. 3.2). Möglicherweise werden die virusverdächtigen Blattsymptome erst ab einem bestimmten Alter der Sämlinge ausgeprägt. Um die vermutete Saatgutübertragbarkeit des Agens bestätigen zu können ist die Beobachtung der Sämlinge auch in den folgenden Jahren erforderlich. Nach erfolgreicher Charakterisierung des Erregers sollten spezifische Primer entwickelt und das Saatgut erkrankter Stieleichen mittels RT-PCR überprüft werden.

Elektronenmikroskopische Studien ermöglichen den nativen Nachweis von Viren in Adsorptionspräparaten. Bei der elektronenoptischen Darstellung von Viren anhand ihrer charakteristischen Morphologie, die eine Gruppenzuordnung erlaubt, können jedoch zahlreiche Probleme auftreten (BÜTTNER et al., 1996). So können beispielsweise Hemmstoffe und oxidative Prozesse die Nachweisteknik stören. Ebenso lassen die häufig ungleichmäßige Verteilung der Viren im Gehölz sowie deren geringe Konzentration oft nur einen ungenügenden Nachweis zu.

In eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten neben isometrischen Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 30-40 nm, stäbchenförmige Partikeln mit einer Länge von etwa 120 nm und flexible Partikeln von etwa 450 nm in Blatthomogenaten symptomtragender Stieleichen gezeigt werden (Kap. 3.3, Kap. 3.4.1). STEINMÖLLER et al. (2004) hatten in vorangegangenen Untersuchungen ebenfalls isometrische Partikeln dieser Größe in Pflanzenhomogenaten und teilgereinigten Blattpresssäften von Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken darstellen können, nicht jedoch die stäbchen- und fadenförmigen Partikeln.

Isometrische Viruspartikeln weisen durch ihre ikosaedrische Form meistens eine deutliche Oberflächenstruktur auf. Diese konnte an den sphärischen Partikeln aus Eiche nicht beobachtet werden. Es ist möglich, dass die Oberflächenstruktur aufgrund mangelhafter Kontrastierung nicht erkennbar war. Trotz verlängerter Inkubationszeit des Kontrastmittels und der Verwendung einer 2 %igen Uranylacetatlösung konnte keine stärkere Kontrastierung der Oberfläche erreicht werden. Viele phytopathogene Virusgenera, die in Gehölzen beschrieben werden, weisen Viren mit isometrischen Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 30-40 nm auf. Zu ihnen gehören Nepoviren, Ilarviren, Dianthoviren, Cucumoviren, Bromoviren und Alphacryptoviren (BRUNT et al., 1996). Eine Zuordnung der aus Eichenproben isolierten isometrischen Partikeln konnte somit allein auf Basis der elektronenoptisch ausgewerteten Adsorptionspräparate nicht erfolgen.

Um die isometrischen Viruspartikeln anzureichern, wurde Blattmaterial von Stieleichen mit Symptomen nach der Methode von HENTSCH (1998) aufgereinigt. Dem Autor war es mit dieser Methode gelungen, sphärische Viruspartikeln aus Rosskastanie zu

isolieren. STEINMÖLLER et al. (2004) konnten in vorangegangenen Untersuchungen mit der Virusreinigung nach HENTSCH (1998) bereits erfolgreich isometrische Viruspartikeln aus Blattmaterial erkrankter Stieleichen anreichern.

Zur Beseitigung unerwünschter Proteine wurde das Blattmaterial zunächst einer Vorklärung mit Bentonit unterzogen. DUNN & HITCHBORN (1965) fanden heraus, dass die anschließende Differentialzentrifugation durch die Vorklärung mit Bentonit um einige Zyklen verkürzt werden kann. Dieser Aspekt ist für die Reinigung instabiler Viren von besonderer Bedeutung. In eigenen Untersuchungen konnten durch die Vorklärung mit einer magnesiumhaltigen Bentonitsuspension und anschließender differentieller Zentrifugation isometrische Viruspartikeln aus Stieleichenblättern mit chlorotischen Ringflecken isoliert werden. In zwei Proben wurden darüber hinaus stäbchenförmige Viruspartikeln detektiert (Kap. 3.4.1). Auch LISTER & HADIDI (1971) sowie FUCHS & MERKER (1985) setzten magnesiumhaltige Bentonitsuspensionen erfolgreich zur Isolierung des instabilen *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) ein. Zur Stabilisierung der Viren fügten DUNN & HITCHBORN (1965) die Bentonitsuspension bereits während der Extraktionsphase zu. Da in den Vorarbeiten von STEINMÖLLER et al. (2004) durch eine Vorklärung im Anschluss an die Extraktion nur wenige virusverdächtige Partikeln isoliert werden konnten, wurde in den eigenen Untersuchungen das Bentonit bereits dem Extraktionspuffer zugesetzt. Es gelang damit nicht, die Anzahl isolierter Viruspartikeln aus Stieleichen zu erhöhen. DUNN & HITCHBORN (1965) sowie FUCHS & MERKER (1985) setzten eine höhere Menge an Bentonitsuspension ein. Im Vergleich zu den Untersuchungen von HENTSCH (1998) und STEINMÖLLER et al. (2004) konnte auch mit einer Verdopplung der Menge an Bentonitlösung in der eigenen Arbeit keine Anreicherung der Viruspartikeln nach der Differentialzentrifugation erreicht werden. Als Ursache muss neben dem unbekannten Ausgangstitern im Blattmaterial auch die Zusammensetzung der Bentonitsuspension bzw. deren Magnesiumgehalt diskutiert werden. So konnten DUNN & HITCHBORN (1965) Unterschiede in der Adsorption der Viruspartikeln in Abhängigkeit des Magnesiumgehaltes in der Bentonitlösung feststellen. Nach Aussage der Autoren üben die Art und Zusammensetzung der Pufferlösung ebenfalls einen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten aus. In folgenden Untersuchungen sollte daher geprüft werden, ob sich eine Veränderung der Magnesiumkonzentration in der Bentonitlösung oder der Einsatz von Magnesiumsulfat zum Extraktionspuffer positiv auf die Höhe des Virustiters in der aufgereinigten Virussuspension auswirkt.

Durch die Differentialzentrifugation können Viruspartikeln aus einem Flüssigmedium isoliert werden. Eine Trennung von Partikeln unterschiedlicher Größe kann durch eine Zonalzentrifugation in einem Dichtegradienten erfolgen (DANIELSSON et al., 1978; MIKKELSEN & CORTÓN, 2004). Sphärische Partikeln aus Blättern erkrankter Stieleichen wurden daher alternativ durch eine Vorklärung mit Chloroform und anschließender Dichtegradienten-

zentrifugation nach REBENSTORF (2002) aufgereinigt. Die Zuckerlösung mit nach unten ansteigender Dichte verhindert, dass schneller sedimentierende Partikeln vorzeitig den Boden erreichen. Die hohe Viskosität der Zuckerlösung hat zudem eine verringerte Diffusion und Konvektion und damit eine geringere Bandenbreite der zu trennenden Partikeln zur Folge. REBENSTORF (2002) gelang es mit dieser Methode reproduzierbar *Cherry leaf roll virus* (CLRV)-Partikeln aufzureinigen.

Durch die Reinigungsverfahren nach HENTSCH (1998) und REBENSTORF (2002) konnten in der eigenen Arbeit unter anderem isometrische Viruspartikeln mit einem Durchmesser von ca. 25-30 nm aus symptomtragenden Stieleichenblättern angereichert werden (Kap. 3.4.1). Da Stieleichen vergesellschaftet mit Birken vorkamen (Kap. 3.1) war zu prüfen, ob es sich bei den isometrischen Partikeln um das Kirschenblatrollvirus handelt. CLRV ist in Forstgehölzen weit verbreitet. Über das Auftreten von CLRV in Ulmen, Sandbirken, Esche und Holunder wurde erstmals Mitte des 20. Jahrhunderts berichtet (VARNEY & MOORE, 1952; SCHMELZER, 1966; JONES & MURANT, 1971; SCHMELZER, 1972; FORD et al., 1972; HORVÁTH et al., 1975; COOPER & ATKINSON, 1975; NIENHAUS & HAMACHER, 1990). In späteren Untersuchungen wurden Rotbuche (WINTER & NIENHAUS, 1989; ACKERMANN, 1991) und Walnuss (BORJA et al., 1996) als holzige Wirte bestätigt. Durch die mögliche Übertragung über Vektoren, Wasser und Böden (FRITSCHKE & KEGLER, 1966, JONES & WOOD, 1978; COOPER & EDWARDS, 1980; JONES et al., 1981; BRUNT et al., 1996) ist eine Infektion der Stieleichen mit diesem Virus denkbar. NIENHAUS (1985a) war es gelungen, aus Traubeneichen mit chlorotischen Ringflecken und Linienmustern isometrische Partikeln zu isolieren, die denen der Nepoviren ähnlich waren.

Blatthomogenate und teilgereinigte Blattpresssäfte reagierten im ELISA nicht mit Antikörpern gegen CLRV (Kap. 3.4.1). Dies bestätigt Untersuchungen von FÜHRLING (1994). Es ist davon auszugehen, dass der hohe Gehalt an Polysacchariden und Gerbstoffen in Stieleichen (FÜHRLING, 1994), sowie die ungleichmäßige Verteilung der Viren im Gehölz den serologischen Nachweis erschweren (BITTERLIN et al., 1984; FUCHS & GRÜNZIG, 1994; GRÜNZIG et al., 1994; BÜTTNER et al., 1996).

Wesentlich sensitiver als serologische Nachweisverfahren ist die PCR (RYU & PARK, 1995). Die hohe Sensitivität und Spezifität der Methode macht das Verfahren für den Nachweis von Viren in Gehölzen besonders geeignet, da diese oft in geringer Konzentration und ungleichmäßig verteilt vorliegen. In einer RT-PCR mit dem hochkonservierten Primerpaar RW1/RW2 (WERNER et al., 1997) konnten in Gesamt-RNA und dsRNA von Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken keine CLRV-spezifischen Fragmente amplifiziert werden.

Weder serologisch noch durch IC-RT-PCR war CLRV in Stieleichen mit virusverdächtigen Blattsymptomen nachzuweisen. Dies könnte zum einen auf den bereits erwähnten geringen Virustiter oder die Inhibitoren zurückzuführen sein, die den PCR-Nachweis beeinträchtigen.

Zum anderen ist unklar, ob CLRV als Verursacher der Ringfleckigkeit an Stieleichen in Frage kommt. Zur abschließenden Klärung könnten in noch anzustellenden Versuchen die in Stieleichen mit Ringflecken angereicherten Virussuspensionen, in denen elektronenoptisch isometrische Partikeln nachweisbar waren, in einer RT-PCR mit CLRV-spezifischen Primern getestet werden.

Auch andere Forstgehölze zeigen virusinduzierte chlorotische Ringflecken. So ist die Ringfleckigkeit der Ebereschen in Forstbeständen weit verbreitet. In ihrer Symptomausprägung ist sie der Ringfleckigkeit an Stieleichen sehr ähnlich (KEGLER, 1960; FÜHRLING & BÜTTNER; 1998; BENTHACK, 2001). MIELKE (2004) sowie BENTHACK et al. (2005) entwickelten Primer zum Nachweis des Erregers der Ringfleckigkeit an Ebereschen. Die molekularbiologische Charakterisierung des Virus ermöglichte eine Zuordnung zu den Bunyaviren, zu denen auch die pflanzenpathogenen Tospoviren zählen. Virusinfizierte Ebereschen traten am Standort Berlin-Grunewald vergesellschaftet mit erkrankten Stieleichen auf (Kap. 3.1). In einer RT-PCR mit den spezifischen Primern für das Virus in Ebereschen und Gesamt-RNA aus Blättern und Rinde symptomtragender Stieleichen konnte eine Infektion der Stieleichen mit diesem Erreger nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise war die Konzentration der viralen RNA in Gesamt-RNA-Präparationen zu gering, so dass der Erreger nicht aufgezeigt werden konnte. Um eine Infektion mit dem Erreger der Ebereschenringfleckigkeit ausschließen zu können, sollten in weiterführenden Untersuchungen angereicherte dsRNA aus Stieleichen oder teilgereinigte Blattpresssäfte zur Amplifikation eingesetzt werden. Vermutlich kommt dieses Agens jedoch nicht als Verursacher der Eichenringfleckigkeit in Frage.

Frühere Studien berichten über eine Verbreitung von Potex- bzw. Potyviren in Stieleichen (NIENHAUS, 1985a), Waldböden (Büttner & NIENHAUS, 1989b) und Gewässern (Büttner & NIENHAUS, 1989a). Im Blatthomogenat einer Stieleiche mit chlorotischen Ringflecken konnte elektronenmikroskopisch ein flexibles Partikel dargestellt werden (Kap. 3.3). KIM & FULTON (1973) wiesen bereits in Färbereichen mit dem gleichen Symptombild Partikeln dieser Morphologie nach. Mit der von DIJKSTRA et al. (1996) beschriebenen Methode zur Aufreinigung verschiedenster Potyviren gelang es in der eigenen Arbeit nicht, die flexiblen Partikeln aus Stieleichenblättern mit chlorotischen Ringflecken anzureichern. Möglicherweise eignet sich dieses Verfahren nicht für die Extraktion solcher Viruspartikeln aus Stieleichen. Es bleibt zu klären, ob Potyviren oder Viren mit ähnlichen Partikeln wie Carla- oder Potexviren als symptominduzierenden Erreger der Ringfleckigkeit an Stieleichen in Frage kommen. In weiterführenden Arbeiten könnten zum einen alternative Aufreinigungsverfahren getestet und zum anderen Gesamt-RNA erkrankter Stieleichen in einer PCR mit gruppenspezifischen Primern untersucht werden.

Aus zwei Mischproben erkrankter Stieleichen (E 151, E 152) konnten neben den bereits beschriebenen isometrischen Partikeln stäbchenförmige Viruspartikeln nach der Aufreinigungsmethode von HENTSCH (1998) isoliert werden (Kap. 3.3, Kap. 3.4.3).

Aufgrund ihrer Morphologie wurden sie den Tobamoviren zugeordnet. SCHMELZER et al. (1966) konnten in Stieleichen mit Blattscheckung bereits stäbchenförmige Viruspartikeln von 300 nm Länge elektronenoptisch darstellen. YARWOOD & HECHT-POINAR (1970) wiesen in Kalifornien TMV in Eichen mit und ohne Virussymptomen nach. NIENHAUS & YARWOOD (1972) vermuten daher eine weit verbreitete latente TMV-Infektion in kalifornischen Eichenbeständen. TMV-ähnliche Partikeln wurden ebenso in deformierten Blättern der Zerreiche in Ungarn gefunden (HORVÁTH et al., 1975).

In der eigenen Arbeit konnten die stäbchenförmigen Partikeln von 450 nm in zwei Proben (E 151 und E 152) nur im Anschluss an die Anreicherung des Erregers durch Differentialzentrifugation elektronenoptisch dargestellt werden. In Tropfpräparaten von Blatthomogenaten erkrankter Stieleichen gelang es nicht, diese Viruspartikeln zu zeigen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von NIENHAUS (1975), der die fehlende Darstellung auf die geringe Viruskonzentration in Stieleichen zurückführt. NIENHAUS & YARWOOD (1972) gelang es aus elf Eichenarten unabhängig von der Symptomausprägung TMV auf *Chenopodium*-Pflanzen zu übertragen, nachdem sie den Rohextrakt zur Abtrennung von Virusinhibitoren über ein Sephadex G 100-Gelbett fraktioniert hatten. Die Autoren schlossen aufgrund des Auftretens unterschiedlicher Symptome an den mechanisch inokulierten Testpflanzen auf verschiedene TMV-Stämme. Eigene Ergebnisse bestätigen diese Vermutung nicht. Die Tabakpflanzen zeigten nach der mechanischen Inokulation mit den TMV-Isolaten aus Stieleichen Blattdeformationen und Nekrosen, an *Chenopodium quinoa* waren chlorotischen Lokalläsionen zu beobachten. Diese Symptome wurden ebenfalls durch die Inokulation mit ToMV-Isolaten induziert (Kap. 3.4.3). Die Differenzierung von Tobamoviruspezies anhand von Symptomen ist schwierig, da es keine differenzierenden Wirtspflanzen gibt (LETSCHERT, 2003).

Das Blatthomogenat aus Indikatorpflanzen reagierte sowohl mit dem Antiserum gegen TMV als auch mit demjenigen gegen ToMV. Auch im Agargeldoppeldiffusionstest konnte nicht zwischen diesen beiden Viren unterschieden werden (Kap. 3.4.3). Die Ursache sind vermutlich Kreuzreaktionen dieser Antiseren, welche durch den ähnlichen Aufbau der Hüllproteine verschiedener Tobamoviruspezies bedingt werden (JACOBI & CASTELLO, 1991; FILLHART et al., 1998; JACOBI et al., 1998; LETSCHERT et al., 2002; KAMENOVA & ADKINS, 2004). Bislang sind jedoch kaum monoklonale Antikörper verfügbar, womit eine eindeutige Differenzierung der Tobamoviruspezies möglich wäre (LETSCHERT, 2003). Molekulargenetische Nachweisverfahren, wie die PCR, sind daher von besonderer Bedeutung. Für die Differenzierung ist es notwendig, einen variablen Bereich des Genoms

zu wählen. Analysen haben gezeigt, dass die größte Heterogenität im Bereich des Hüll- und Transportproteingens zu finden ist. Da beide Gene direkt mit den Wirtsproteinen interagieren, scheinen sie einem hohem Selektionsdruck zu unterliegen, was diese Genombereiche zur Differenzierung besonders geeignet macht (BERZAL-HERRANZ et al., 1995; DE LA CRUZ et al., 1997).

Mit Hilfe einer IC-RT-PCR nach JACOBI et al. (1998) konnte ein Isolat (E 151) mit einer Identität von 99,8 % über einen Bereich von 508 bp des viralen Transportproteingens dem Genus ToMV zugeordnet werden. Das zweite Isolat (E 152) wurde in einer RT-PCR mit spezifischen Primern für das Hüllproteingen nach LETSCHERT et al. (2002) mit einer Identität von 97 % über den Bereich von 795 bp als TMV-Isolat charakterisiert. Um die beiden Isolate aus Stieleiche miteinander vergleichen und phylogenetisch einordnen zu können, wurde ein Alignment mit dem Gesamt-Genom definierter TMV und ToMV-Isolate durchgeführt. Unklare Zuordnungen vieler Tobamovirus- Isolate in den Internetsequenzdatenbanken erschwerten jedoch die Differenzierung der Isolate. Genaue Sequenzinformationen zu TMV 'tomato strain' (ToMV) erhielten OHNO et al. (1984) durch eine cDNA-Klonierung. Sie stellten eine Homologie von etwa 80 % zu TMV *vulgare* fest. Die endgültige Zuordnung der Isolate aus Stieleiche basiert auf den definierten Referenzisolaten ToMV (X02144) und TMV (X68110), auf welche sich bereits die Autoren JACOBI et al. (1998) und LETSCHERT et al. (2002) beziehen. Dass keine 100 %ige Übereinstimmung erreicht wird liegt darin begründet, dass auch innerhalb einer Spezies Nukleotidaustausche vorkommen können. Diese werden durch die relativ hohe Fehlerrate der RNA abhängigen RNA Polymerase (RdRp) während der Replikation des Virus verursacht. Die Mutationsrate pflanzlicher Viren wird ähnlich hoch eingeschätzt wie die tierpathogener Viren, welche nach DOMINGO & HOLLAND (1994) 10^{-4} beträgt.

Auf Basis der Sequenzanalysen ist anzunehmen, dass sowohl ein ToMV- als auch ein TMV-Isolat aus Stieleichen isoliert wurde. Die Genomorganisation der Tobamovirusgruppe der *Solanaeae*, zu der TMV und ToMV zählen, zeigt, dass der 'Open Reading Frame' (ORF) des Hüllproteingens und der ORF des Transportproteingens durch einige Nukleotide getrennt ist. Die Sequenz dieses Bereiches fehlt, um beide Isolate direkt miteinander vergleichen zu können. Daher ist es ebenso denkbar, dass es sich bei den beiden Isolaten aus Stieleiche um ein einziges rekombinantes Isolat handelt, welches im Bereich des Transportproteingens eine Identität zu ToMV und im Bereich des Hüllproteingens eine Identität zu TMV aufweist. Es bedarf daher noch weitere Genomanalysen.

Da Tobamoviren aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften außerordentlich stabil sind und über mehr als 10 Jahre infektiös bleiben, wurde mit großer Sorgfalt darauf geachtet, Fremdkontaminationen auszuschließen. Eine Laborkontamination für das Isolat E 152 kommt nicht in Betracht, da die Sequenzen der Vergleichsisolate E 317, 5/11/1988 und

13/08/1989 nicht mit den Hüllproteinsequenzen des in Stieleiche definierten TMV-Isolates übereinstimmten. Ein direkter Vergleich mit dem aus Stieleiche isolierten ToMV-Isolat E 151 war nicht möglich, da von diesem nur Sequenzinformationen im Bereich des Transportproteingens vorliegen. Im Vergleich zu dem ToMV-Referenzisolat erzielten alle ToMV-Isolate eine Übereinstimmung von etwa 99 %. Eine Kontamination mit einem dieser Isolate kann daher für E 151 nicht ausgeschlossen werden.

Ein ursächlicher Zusammenhang von TMV und ToMV mit den an Eichen beobachteten chlorotischen Ringflecken wird in vorherigen Untersuchungen angezweifelt (KIM & FULTON, 1973; NIENHAUS, 1975; FÜHRLING, 1994). In der eigenen Arbeit wurden beide Tobamovirusisolate aus Blattmaterial mit chlorotischen Ringflecken gewonnen. Es wurde durch die Rückübertragung des TMV-Isolates E 152 auf Eichensämlinge versucht, das Vorkommen von Tobamoviren in Stieleichen zu belegen. Die Erfüllung der Koch'schen Postulate schreibt die Rückübertragung des aus den Indikatorpflanzen isolierten Erregers auf die natürliche Wirtspflanze vor. Es ist allerdings schwierig Viren durch mechanische Inokulation auf holzige Wirte zu übertragen. Als alternative Methode beschreiben GARNSEY et al. (1977) das 'Stem-Slashing'. Verschiedene Viren aus Citrus, wie CTV, *Citrus leaf rugose virus* (CiLRV), *Tatter leaf virus* (TLV) sowie zwei infektiöse dRNAs des CTV konnten mit dieser Methode bereits übertragen werden (GARNSEY et al., 1977; FRISON & TAHER, 1991; CHE et al., 2002; IWANAMI & SHIMIZU, 2004). Durch 'Stem-Slashing' und mechanische Inokulation des Isolates E 152 auf Eichensämlinge gelang es in der eigenen Arbeit bisher nicht die Koch'schen Postulate zu erfüllen. Im Untersuchungszeitraum 2002-2004 konnten an den behandelten Sämlingen weder die chlorotischen Ringflecken, noch TMV-Viruspartikeln in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Blatthomogenaten nachgewiesen werden (Kap. 3.2). Als Ursache ist die lange Latenz zwischen der Infektion und der Entwicklung von Blattsymptomen bzw. der Nachweisbarkeit des Erregers anzunehmen (KEGLER, 1960; NIENHAUS & CASTELLO, 1989). Die Bonitur der behandelten Eichensämlinge auf virusverdächtige Symptome ist auch in den folgenden Jahren erforderlich. Ferner ist denkbar, dass die isolierten Tobamoviren keine charakteristischen Symptome in Stieleichen erzeugen. Dies würde die These einer weit verbreiteten latenten Infektion der Eiche mit Tobamoviren, die NIENHAUS & YARWOOD (1972) für kalifornische Eichenbestände vermuten, bestätigen. Latente Infektionen werden als Anzeichen für extrem geringe Viruskonzentrationen angesehen (NIENHAUS, 1972; NIENHAUS, 1975). Die Virusinfektion in Eichen scheint sehr gering zu sein, denn elektronenoptisch waren die Tobamoviren erst nach einer partiellen Reinigung von Blattextrakten aufzuzeigen (Kap. 3.3). Auch in Gesamt-RNA von Stieleichenblattproben mit verschiedenen Symptombildern gelang es nicht, die Tobamoviren mit Hilfe der RT-PCR nachzuweisen. Durch einen PCR-Nachweis pflanzeneigener Gene in Eichen, wie Ubiquitin oder Aktin (BRUNNER et al., 2004), könnte in

nachfolgenden Untersuchungen getestet werden, ob möglicherweise sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe den direkten Nachweis in Eichenblattproben beeinträchtigen.

Neben den serologischen Verfahren und der Virusaufreinigung bieten molekularbiologische Methoden zur Analyse des viralen Genoms eine Möglichkeit der Identifikation von Viren. Da über 90 % aller phytopathogenen Viren RNA-Genome besitzen (ZAITLIN & HULL, 1987), ist die Voraussetzung zur Amplifikation von viraler cDNA die Isolierung hochreiner, intakter Gesamt-RNA. Für die Extraktion von Gesamt-RNA aus Stieleichen wurden verschiedene Verfahren getestet. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Kit der Fa. Invitak eignete sich nicht für Gesamt-RNA Präparationen aus Stieleichengewebe. Ursache dafür kann der hohe Gehalt an Polyphenolen, wie den Tanninen sein. Diese binden die Nukleinsäuren, die dann nicht mehr durch herkömmliche Verfahren abgetrennt werden können (NEWBURY & POSSINGHAM, 1977; MALIYAKAL, 1992). Aus krautigen Pflanzen konnte mit diesem Verfahren hingegen RNA extrahiert werden. Da die Ausbeute mit 10-15 µg/100 mg Ausgangsmaterial eher gering war, wurde für weitere Untersuchungen ein Extraktionsverfahren, modifiziert nach DELLAPORTA et al. (1983) angewendet, welches ursprünglich für die Isolierung von Gesamt-Nukleinsäuren entwickelt worden war. Zur Entfernung von Proteinen wurde dieses Verfahren in der eigenen Arbeit durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion ergänzt. Für die Präparation der Gesamt-RNA wurde zusätzlich ein Verdau mit DNase 1 mit anschließender Ethanol-fällung durchgeführt. Somit war es möglich, große Mengen Gesamt-RNA aus verschiedenen Stieleichengewebe zu gewinnen. Da die Gesamt-RNA teilweise degradiert war, wurde alternativ das Extraktionsverfahren modifiziert nach BOOM et al. (1990) angewendet. Die Autoren fanden heraus, dass Nukleinsäuren in Gegenwart von chaotropen Reagenzien mit hoher Effizienz an Silica-Partikel binden. Die Autoren extrahierten mit dieser Methode verschiedenste Nukleinsäuren aus menschlichem Serum und Urin. Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen holzigen Pflanzen wie Kirsche (ROTT & JELKMANN, 2001; 2005) Apfel (MENZEL et al., 2002) und Eberesche (MIELKE, 2004) wurde das Verfahren bereits erfolgreich eingesetzt. Auch aus menschlichem und tierischem Serum, Urin und Kot wurden Nukleinsäuren mit Hilfe dieser Extraktionsmethode gewonnen (BOOM et al., 1990; VAN DER HOECK et al., 1995; BASTOS et al., 2001). MIELKE (2004) modifizierte das Protokoll durch die Zugabe von 2,5 % PVP zum Extraktionspuffer. Diese Substanz bildet durch Wasserstoffbrückenbindungen Komplexe mit Polyphenolen, die sich infolgedessen vom Pflanzenhomogenat abtrennen lassen. Durch die Ergänzung einer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung können Proteine und RNasen entfernt werden. Somit war es der Autorin gelungen, hochreine und intakte RNA aus Ebereschengewebe zu isolieren. Das Verfahren eignete sich in der eigenen Arbeit ebenfalls zur Extraktion qualitativ

hochwertiger Gesamt-RNA aus Blättern, Rinde und Knospen von Stieleichen, die ein ideales Template für die nachfolgende RT-PCR darstellte.

Die Isolierung von dsRNA wird bevorzugt zur Diagnose verwendet, wenn Viren nicht übertragbar sind oder keine Partikeln isoliert werden können (JORDAN et al., 1983).

Diese Methode wird daher besonders häufig für die Charakterisierung von Viren aus holzigen Pflanzen eingesetzt, da deren hoher Gehalte an Phenolen und Polysacchariden die Übertragung und Isolierung von Viren erschweren (COX et al., 2000). Bei der Replikation von Viren mit einzelsträngigem (ss)RNA- Genom entstehen intermediäre und replikative Formen. Während die intermediären Formen nur teilweise doppelsträngige RNA (dsRNA) aufweisen, besteht die replikative Form aus einer vollständig durchgepaarten dsRNA. Der Nachweis hochmolekularer dsRNA kann demzufolge als erstes Indiz für eine Virusinfektion angesehen werden, sofern sie in gesunden Pflanzen nicht zu finden ist (DODDS et al., 1984; VALVERDE et al., 1990b). Außer in replikativen Formen und Intermediaten von ssRNA-Viren kann dsRNA aber auch als genomische RNA von dsRNA-Viren und Satelliten-Viren sowie als endogene RNA pflanzlichen Ursprungs vorkommen (DODDS et al., 1984; LUKÁCS, 1994). Doppelsträngige RNAs lassen sich gut durch eine Chromatographie mit CF11-Cellulose in Gegenwart einer Ethanolkonzentration von 15-18% von anderen Nukleinsäuren abtrennen (FRANKLIN, 1996). Nach der Auftrennung der isolierten dsRNA im elektrischen Feld, ist anhand des entstandenen Bandenmusters eine Differenzierung von Viren möglich. Die dsRNA-Isolierung kann somit Hinweise zur Taxonomie von Viren geben und die Zuordnung zu bestimmten Virusgruppen ermöglichen.

Die Befunde der eigenen dsRNA-Analysen in Stieleichen beruhen hauptsächlich auf den in den Monaten Mai bis Juli entnommenem Blattproben. Zu diesem Zeitpunkt kann meistens eine zuverlässige visuelle Bonitur und Bewertung im Freiland erfolgen, da die virusverdächtigen Blattsymptome noch nicht durch andere biotische und abiotische Schadfaktoren maskiert werden (FÜHRLING, 1994). Der Gehalt an phenolischen Verbindungen, zu denen Gerbstoffe wie Tannine gehören, ist im Blatt- und Rindengewebe der Stieleiche mit bis zu 20 % sehr hoch. Diese behindern nicht nur die Isolierung von dsRNA, sondern binden und denaturieren virale Enzyme (SCALBERT, 1991). Daher empfehlen auch DODDS et al. (1984) eine Probenahme im Frühjahr bzw. Frühsommer. In diesem Zeitraum können aufgrund verhältnismäßig geringer Mengen an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in den jungen Blättern hohe Ausbeuten und Reinheiten bei der Nukleinsäureextraktion erzielt werden (FÜHRLING, 1994). Diese Angabe konnte in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. DsRNA-Extrakte aus Stieleichenblättern mit Ringflecken, die im Verlauf der Vegetationsperiode hergestellt wurden, wiesen während des gesamten Untersuchungszeitraumes zwischen Mai und August hohe Gerbstoffgehalte auf,

die vermutlich die dsRNA-Ausbeute stark beeinträchtigten. Erst aus im Oktober entnommene Proben ließ sich die dsRNA bei gleich bleibender Qualität und Quantität nach vereinfachtem Protokoll extrahieren (Kap. 3.5.2) (ROTT et al., 2004). Dies könnte auf einen geringeren Gehalt an phenolischen Verbindungen zurückzuführen sein. SALMINEN et al. (2004) führten Untersuchungen zur jahreszeitlichen Veränderung der Konzentration an hydrolysierbaren Tanninen, Flavonoidglykosiden und Proanthocyanen in Eichenblättern durch. Die Autoren stellten fest, dass der Gehalt an hydrolysierbaren Tanninen, welche den größten Teil der phenolische Verbindungen ausmachen, im Mai und Juni am höchsten ist. Im Verlauf der Vegetationsperiode sinkt er um mehr als die Hälfte ab und erreicht sein Minimum im Oktober in seneszenten Blättern. Gleiches beobachteten BEDGOOD et al. (2005) bei der Bestimmung einfacher Biophenole in Eichen. Dies spricht für eine Entnahme der Blattproben gegen Ende der Vegetationsperiode, um die dsRNA-Verluste bei der Isolierung zu minimieren, die mit der Extraktion von Blattmaterial mit hohem Gerbstoffgehalt einhergehen können (Kap. 3.5.2). Durch frühzeitige Markierung von Pflanzen mit typischen Symptomen kann geeignetes Untersuchungsmaterial auch später im Jahr entnommen werden, wenn die Symptome durch sekundäre Infektionen maskiert worden sind.

Verschiedene Modifikationen des dsRNA-Extraktionsverfahrens nach BENTHACK (2001) wurden auf ihre Eignung für die Isolierung von dsRNA aus jungen Eichenblättern überprüft. Positiv wirkte sich eine Vorklärung des Blattpresssaftes mit Chloroform und Phenol aus. Durch die Erhöhung des Extraktionspuffervolumens, wie von DODDS et al. (1984) zur Reduzierung der Viskosität des Pflanzenpresssaftes vorgeschlagen, konnten die Schleimstoffe verdünnt und leichter ausgewaschen werden. Die Absenkung des pH-Wertes im Extraktionspuffer bewirkt die Anreicherung von Protonen, welche die reaktiven OH-Gruppen der Phenolmoleküle inaktivieren (PIERPOINT, 2003). So kann das Aggregieren der Moleküle vermindert (PIERPOINT, 2003) und die Eluierung der dsRNA aus der CF11-Cellulose erleichtert werden. Um eine ausreichende Pufferwirkung zu erhalten und die dsRNA nicht zu degradieren wurde der pH-Wert auf maximal 5,5 abgesenkt. Die höchste dsRNA-Konzentration wurde bei einem pH-Wert von 6,0 erzielt (ROTT et al., 2004). Eine Erleichterung der Elution der dsRNA konnte allerdings nicht erreicht werden. In noch anzustellenden Versuchen sollten daher alkalische Pufferlösungen geprüft werden, da die sauren Phenole mit Alkalilaugen wasserlösliche Salze bilden, die bei der Eluierung der dsRNA nicht mehr stören würden. ZHANG et al. (1998) setzten zur Extraktion von dsRNA aus *Prunus* zusätzlich Bentonit ein. An die hochaktive Oberfläche von Bentonit können Proteine gebunden und mittels Zentrifugation beseitigt werden (DEPAULO & POWELL, 1995). DsRNA könnte demzufolge durch eine Zugabe von Bentonit zum Extraktionspuffer ebenso gut isoliert werden, wie Viruspartikeln nach dem Aufreinigungsverfahren von HENTSCH (1998). Der Einsatz von Bentonit zum Extraktionspuffer wirkte sich jedoch nicht positiv auf die

Ausbeute isolierter dsRNA aus. Bentonit bindet unspezifisch Proteine, so dass nicht nur pflanzliche, sondern auch virale Proteine mit diesem Zusatzstoff entfernt werden können. KÖNIG & ROFFAEL (2003) setzten zur Extraktion von Tanninen aus Fichtenrinde heißes Wasser ein. Für dsRNA-Isolierungen aus dem tanninhaltigen Eichengewebe könnte versucht werden, dass Pflanzenmaterial vor der Extraktion mit heißem Wasser zu behandeln. Die dsRNA sollte durch die Hitze nicht degradiert werden, da es KARAN et al. (1991) gelang, dsRNA auch aus Blattmaterial von Pangola Gras zu isolieren, welches bei 105 °C getrocknet worden war. KÖNIG & ROFFAEL (2003) extrahierten Tannine ebenso durch den Einsatz von wässrigen Harnstofflösungen und Harnstoff-Formaldehyd-Polymeren aus Fichtenrinde. Neben Harnstoffverbindungen sollte in weiteren Untersuchungen PEG zur Beseitigung der Tannine aus Eichengewebe eingesetzt werden. MAKKAR et al. (1995), GETACHEW (1999) sowie MAKKAR (2005) gelang es mit Hilfe von PEG, Tannine aus tropischen Gehölzen zu binden und zu entfernen. Auch K_2CO_3 und $Ca(OH)_2$ eignen sich als tanninbindende Substanzen (MAKKAR, 2005).

Alternativ zur Chromatographiesäule wurde die dsRNA aus Stieleichen im 'Batch-Verfahren' von der CF11-Cellulose getrennt. Bei der Eluierung aus der Chromatographiesäule wurden die Nukleinsäuren mit Hilfe eines 1 x STE-Puffers gelöst und aus der CF11-Cellulose filtriert. Beim 'Batch-Verfahren' hingegen wurde die CF11-Cellulose durch Zentrifugation sedimentiert, so dass die gelösten Nukleinsäuren im EtOH-freien Puffer im Überstand zurückblieben. Ein Teil der Nukleinsäuren verblieb durch die Gravitationskräfte in der Cellulose und konnte damit nicht vollständig im Puffer aufgefangen werden. Auch Pufferrückstände im Zentrifugenröhrchen trugen zu einem dsRNA-Verlust von etwa 50 % bei. Der Einsatz des 'Batch-Verfahren' kann daher nur zum Waschen der CF11-Cellulose-gebundene Nukleinsäuren empfohlen werden. Die Eluierung sollte anschließend auf einer Chromatographiesäule erfolgen.

Die Lagerdauer und -temperatur des tiefgefrorenen Probenmaterials übten keinen Einfluss auf die Qualität und die Konzentration der dsRNA aus (Kap. 3.5.2). Die charakteristischen Doppelbanden konnten sowohl aus Blattmaterial welches bei -80 °C als auch bei -20 °C gelagert worden war isoliert werden. KARAN et al. (1991) gehen von einer hohen Stabilität der Nukleinsäuren von dsRNA-Viren aus. Die Autoren extrahierten dsRNA von *Pangola stunt virus* (PaSV) und *Fiji disease virus* (FDV) aus Blättern, welche bei 105 °C getrocknet, bei Raumtemperatur oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt worden waren. PaSV-dsRNA konnte ebenso in geringen Mengen aus Blättern isoliert werden, die für vier Wochen bei 23-37 °C gelagert worden waren. DsRNA ist durch starke Wechselwirkungen der Wasserstoffbrückenbindungen in Verbindung mit der Ribonukleinsäurerückrat- Konformation stabiler als RNA-DNA oder DNA-DNA-Doppelstränge, was sich in einer hohen Schmelztemperatur ausdrückt (MATTHEWS, 1991; LIBONATI et al., 1980). Für lange

Transporte könnte das Pflanzenmaterial somit auch getrocknet werden. Durch die Dehydrierung steigt die Salzkonzentration im Zytoplasma, die dsRNA wird aus den zerstörten Virionen freigesetzt und kann ihre doppelsträngige Struktur behalten (KARAN et al., 1991).

Die CF11-gereinigten dsRNA-Extrakte aus Stieleichenblättern zeigten symptomunabhängig bei der gelelektrophoretischen Auftrennung zwei oder vier als Doppelbande auftretende dsRNA-Fragmente mit Größen von 1,6 kbp und 1,5 kbp sowie 2,0 und 1,8 kbp. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von FÜHRLING (1994). Die Autorin trennte CF11-Cellulose gereinigte Nukleinsäurerohextrakte im Polyacrylamidgel auf und konnte nach Silberfärbung dsRNA mit Längen von 1,5 bis 2,0 kbp sowohl in symptomlosem Blattmaterial als auch in Blattmaterial von Stieleichen mit virusverdächtigen Symptomen nachweisen. Die doppelsträngige Struktur der Nukleinsäuren konnte anhand des Immunoblottings mit einem dsRNA spezifischen monoklonalen Antikörper gezeigt werden (FÜHRLING, 1994; LUKÁCS, 1994).

Eine Überprüfung von zwei Rinden- und Knospenproben erkrankter sowie einer Rindenprobe einer symptomlosen Stieleiche zeigte, dass diese dsRNA-Fragmente in beiden Gewebearten in gleicher Qualität jedoch in wesentlich höherer Konzentration als im Blattgewebe vorliegen. Aus Rindengewebe konnte in etwa die 25-fache Menge an dsRNA isoliert werden wie aus Blattmaterial. Der Gehalt an dsRNA in Knospen war etwa zehnmal so hoch wie im Blattgewebe. Diese Ergebnisse stehen nicht in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus vorangegangenen Untersuchungen. FÜHRLING (1994) isolierte dsRNA in gleicher Quantität aus Stengeln, Wurzeln und Blättern von Stieleichensämlingen. BENTHACK (2001) untersuchte das Auftreten von dsRNA in Blättern und Rinde von Ebereschen mit virusverdächtigen Blattsymptomen. Dabei zeigte sich, dass die dsRNA im Rindengewebe niedriger konzentriert vorlag als im Blattgewebe. JORDAN et al. (1983) stellten in ihren Untersuchungen zur Verbreitung und Verteilung eines virusähnlichen Erregers in Avocado ebenfalls fest, dass die dsRNA-Gehalte in Blattextrakten höher waren als in Rinde und Wurzeln.

Die nachgewiesenen doppelsträngigen Ribonukleinsäuren weisen nicht auf einen viralen Erreger in Stieleichen mit chlorotische Ringflecken, Scheckungen und/oder Mosaik hin, da sie auch aus symptomlosen Blattmaterial isoliert werden konnten.

Sowohl die Größe der Banden von 1,5- 2,0 kb als auch das Auftreten als Doppelbanden könnten auf das Vorkommen von kryptischen Viren in Eichen hindeuten. Die Vermutung wird zudem durch das jahreszeitlich unabhängige Auftreten der Doppelbanden bestätigt (Kap. 3.5.2). Kryptische Viren verursachen keine Symptome in ihren Wirtspflanzen und sind weder durch Pfropfung und Inokulation noch durch Vektoren übertragbar. Vielmehr wird eine 80-100 %ige Saatgutübertragung angenommen (BOCCARDO

et al., 1987). Dadurch wäre erklärbar, weshalb in eigenen Übertragungsversuchen durch mechanische Inokulation keine Symptome an Wirtspflanzen erzeugt werden konnten (Kap. 3.2). Die fehlende Infektiosität und der symptomfreie Krankheitsverlauf schließen die Erfüllung der Koch'schen Postulate als Beweis einer infektiösen Krankheit aus. FÜHRLING (1994) sowie BÜTTNER et al. (1996) vermuteten bereits eine Kontamination der Eichen mit kryptischen Viren. Die Autoren beschreiben gleichermaßen die Isolierung von dsRNA aus Pflanzenmaterial symptomfreier und symptomtragender Stieleichen, konnten jedoch elektronenoptisch die für kryptische Viren typischen isometrischen Viruspartikeln nicht darstellen. Bisher beschriebene kryptische Viren weisen Partikeln mit Größen von 29-32 nm und 37-38 nm auf (LOUISONI et al. 1987; BOCCARDO et al., 1987). Vertreter der kryptischen Viren mit Partikeln von 29-32 nm, wie z.B. *Beet cryptic virus 1* (BCV 1) weisen keine Oberflächenstruktur auf (BOCCARDO et al. 1987; BRUNT et al. 1996). In eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Blatthomogenaten erkrankter Stieleichen konnten isometrische Partikeln von 30-40 nm ohne Oberflächenstruktur dargestellt werden (Kap. 3.3). STEINMÖLLER et al. (2001) beschrieben in ihren Arbeiten ebenso Partikeln dieser Morphologie in symptomtragenden Stieleichenblättern.

Nach einer Nukleokapsidanreicherung aus Blattmaterial symptomloser Stieleichen und Rindengewebe erkrankter Bäume konnte zudem ein Protein von etwa 54 kDa in einer SDS-PAGE dargestellt werden, dessen Größe in etwa mit dem Hüllprotein des BCV 1 übereinstimmte (Kap. 3.4.2). Ein weiteres Merkmal für kryptische Viren ist die geringe Konzentration, in der sie in Wirtspflanzen vorliegen (BOCCARDO et al., 1987; BRUNT et al., 1996). Die Aussage, dass diese Viren gleichmäßig verteilt in allen Gewebearten vorkommen, konnte in eigenen dsRNA-Analysen nicht bestätigt werden. Vielmehr wird eine ungleiche Verteilung der vermutlich kryptischen Viren in Stieleichen angenommen, da die höchste dsRNA-Konzentration in Rindengewebe und die niedrigste im Blattgewebe der Stieleichen festgestellt wurde (Kap. 3.5.2). KÜHNE & STANARIUS (1990) diagnostizierten ebenfalls ein ungleichmäßiges Verteilungsmuster für kryptische Viren in Rüben, wobei BCV 1 im Blattmesophyll am höchsten konzentriert vorzuliegen scheint, während BCV 2 im Phloem lokalisiert ist. Für weitere Erkenntnisse zur Verteilung und Konzentration der kryptischen Viren in Stieleichen sollten Viruspartikeln isoliert und angereichert werden können. BOCCARDO et al. (1987) empfehlen die Extraktion kryptischer Viren durch den Zusatz von Antioxidantien (DIECA, Thioglycollat) zum Extraktionspuffer und eine Vorklärung mit Chloroform und anschließend niedrigtouriger Zentrifugation zur Phasentrennung. Die Reinigung mittels PEG-Fällung hingegen führte in früheren Untersuchungen durch die Gelatierung der Pflanzenextrakte zum Verlust von Viruspartikeln. Kryptische Viren aus Pfeffer konnten jedoch mit Hilfe der PEG-Fällung angereichert werden (ARANCIBIA et al., 1995). KASSANIS et al. (1977) setzten zur Reinigung von *Beet cryptic virus 1+2* (BCV),

Raddish yellow edge virus (RYEV), *Alfalfa cryptic virus* (ACV) und *White clover temperate virus* (WCTeV) erfolgreich die Dichtegradientenzentrifugation ein. STEINMÖLLER et al. (2004) gelang es die isometrischen Partikeln in geringer Konzentration durch eine Vorklärung mit Bentonit aufzukonzentrieren. In der eigenen Arbeit konnten die isometrischen Partikeln sowohl durch die Verwendung eines natriumsulfithaltigen Extraktionspuffers, einer Vorklärung mit Bentonit, PEG-Fällung und anschließend differentieller Zentrifugation als auch durch Ultrazentrifugation über einen Zuckergradienten angereichert werden (Kap. 3.4.1). Es gelang nicht, diese Viruspartikeln aus zwei Proben symptomfreien Blattmaterials zu isolieren.

Zur Amplifikation und Identifikation der dsRNA-Sequenz aus Stieleiche wurden sowohl die RT-DOP-PCR als auch die "klassische" Zweitstrangsynthese mit anschließender Klonierung angewendet. Dafür musste die dsRNA zuvor denaturiert und in eine cDNA umgeschrieben werden. Nach konventioneller Hitzedenaturierung konnten zunächst keine Fragmente in einer RT-DOP-PCR amplifiziert werden (Kap. 3.5.3). Als Ursache wird die unvollständige Denaturierung der dsRNA und eine schnelle Renaturierung der stabilen Struktur angenommen, die bereits von COFFIN & COUTTS (1992) sowie GOODIN (1995) und BATTEN et al. (2000) beschrieben wurde. Nach COFFIN & COUTTS (1991) ist die vollständige Denaturierung der dsRNA die wichtigste Voraussetzung für die erfolgreiche cDNA-Klonierung. Alternativ wurde die dsRNA aus Stieleiche durch Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) denaturiert. Hiermit konnten Fragmente in einer anschließenden RT-DOP-PCR gewonnen, aber nicht kloniert werden (Kap. 3.5.3). CASHDOLLAR et al. (1982) setzten die Denaturierung mit DMSO zur Klonierung genomischer dsRNA aus Reoviren ein. GORZIGLIA et al. (1983) sowie JELKMANN et al. (1989) hingegen bezeichnen diese Methode als ineffektiv für die Reverse Transkription von dsRNA.

Die größte Anzahl rekombinanter Klone wurde in der eigenen Arbeit durch Hitzedenaturierung des Primer-dsRNA-Gemisches und sofortiges Überführen auf flüssigen Stickstoff erzielt (Kap. 3.5.3). Durch die Schockfrierung und die Erhöhung des Reaktionsvolumens für die Reverse Transkription von 20 µl auf 100 µl konnte einer Rückfaltung der denaturierten dsRNA-Stränge entgegengewirkt werden.

Nach der Denaturierung wurde die dsRNA bei -80 °C gefällt und in einer RT-DOP-PCR amplifiziert. Das Prinzip der RT-DOP-PCR beruht auf der Verwendung unspezifisch bindender Primer, die einen sechs Nukleotid langen degenerierten Bereich aufweisen und damit die partielle Amplifikation jedes unbekannten (c)DNA-Templates ermöglichen. Dieses PCR-Verfahren ist sehr sensitiv und wurde ursprünglich für die Amplifikation geringer Mengen an chromosomaler DNA entwickelt. ROTT & JELKMANN (2001) setzten diese Methode erstmals zur Amplifikation von cDNA synthetisiert aus viraler dsRNA ein und

identifizierten so verschiedene filamentöse Viren aus Kirsche. BENTHACK et al. (2005) gelang es, durch die Amplifikation von dsRNA-Fragmenten in einer RT-DOP-PCR, ein bis dahin unbekanntes Virus in Ebereschen mit chlorotischen Ringflecken und Scheckung partiell zu charakterisieren. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist, dass sehr geringe Mengen an dsRNA amplifiziert und kloniert werden können. Auch in den eigenen Untersuchungen konnte die RT-DOP-PCR für die Amplifikation von dsRNA aus Stieleichen etabliert werden. Für die Reverse Transkription wurden zunächst hexamere Zufallsprimer eingesetzt, da diese aufgrund ihrer variablen Nukleotidkomposition potentiell viele Bindungsstellen auf dem cDNA-Template besitzen. Nach Amplifikation der Erststrang-cDNA in einem DOP-PCR-Ansatz nach ROCHE (1999) konnten erst nach Reamplifizierung PCR-Produkte erzeugt werden. Zudem waren die Fragmente mit 250-500 bp eher klein und stellten sich nach gelelektrophoretischer Trennung im 1 %igen nativen Agarosegel als "Schmier" dar. Die niedrige Amplifikationsrate könnte durch die geringe Ausgangsmenge der dsRNA verursacht worden sein, die bei maximal 40 ng für die cDNA-Synthese lag (Kap. 3.5.3). Aus 50 g Eichenblattmaterial konnten zwischen 4 bis 40 ng dsRNA isoliert und in die nachfolgende cDNA-Synthese eingesetzt werden. JELKMANN et al. (1989) empfehlen jedoch den Einsatz von 500 ng dsRNA. Als ein weiterer Grund für die geringe Menge an PCR-Produkten und deren unzureichender Länge ist eine unvollständige Denaturierung oder schnelle Rückfaltung der hitzedenaturierten dsRNA in Betracht zu ziehen. So beschreiben JELKMANN et al. (1989) die Verwendung von Methylquecksilber als die effizienteste Methode der dsRNA-Denaturierung. Die Autoren erhielten durch die Denaturierung mit Methylquecksilberhydroxid mehr als doppelt so viele cDNA-Stränge im Vergleich zur Hitzedenaturierung. Ähnliche Ergebnisse erzielte JELKMANN (1995) bei der Charakterisierung eines neuen Capillovirus aus Kirsche sowie THEILMANN et al. (2001) bei der partiellen Charakterisierung eines kanadischen *Little Cherry Disease* (LCD)-Isolates, SABANADZOVIC et al. (2000) bei der Diagnose des GFKV in Weinreben, TZANETAKIS et al. (2004 a und b) bei der Identifizierung des *Strawberry pallidosis virus* (SPaV) und THOMPSON et al. (2002) bei der Charakterisierung des *Strawberry mottle virus* (SMoV). Aufgrund der hohen Humantoxizität ist der Einsatz von Methylquecksilberhydroxid nicht zu empfehlen (ORME & KEGLEY, 2004). Für zukünftige Untersuchungen sollte die Denaturierung der dsRNA mittels Säure getestet werden. YAMAKAWA & NAKAGOMI (1990) schlagen dafür eine 10 min Inkubation in 80 mM HCL vor. Den Autoren gelang es damit erfolgreich dsRNA von Rotaviren, die mittels Ionen-Austausch-Chromatographie isoliert worden war, zu denaturieren und in einer DOT-BLOT-Hybridisierung nachzuweisen. Um distinkte Banden zu erhalten, wurden in weiteren Untersuchungen DOP-Primer für die Reverse Transkription eingesetzt. Diese Primer sind Zufallshexamere, die am 5'- bzw. 3'-Ende zusätzlich einen definierten Sequenzbereich von zwei bis neun Nukleotiden aufweisen.

Dadurch erfolgt eine spezifischere Bindung der DOP-Primer an die DNA als bei Verwendung hexamerer Zufallsprimer. In der eigenen Arbeit wurden zwei DOP-Primer unterschiedlicher Spezifität verwendet, um verschiedene Bereiche der unbekannten dsRNA-Sequenz amplifizieren zu können. In einer RT-DOP-PCR mit dem DOP-Primer Bgl-Eco-RH konnten keine Fragmente amplifiziert werden. Dieser Primer bestand aus 12 Nukleotiden am 5'-Ende und einem Abschnitt von sechs variablen Nukleotiden am 3'-Ende und war damit zu unspezifisch, um eine Amplifikation der dsRNA zu bewirken. Mit Hilfe des DOP-Primers Bgl-Eco RH 2, welcher zwei Cytosine am 3'-Ende aufweist, konnten Fragmente amplifiziert werden, die sich nach gelelektrophoretischer Trennung als Bandenschmear von 1000 bp bis 250 bp darstellten (Kap. 3.5.3). ROTT & JELKMANN (2001) gelang es, durch den Einsatz eines DOP-Primers mit 10 definierten Nukleotiden am 5'-Ende und fünf definierten Nukleotiden am 3'-Ende, distinkte virusspezifische Fragmente zu erzeugen. Bei der hohen Spezifität des Primers ist jedoch die Sequenz der definierten Primerabschnitte für die Amplifizierung des unbekannten Templates von besonderer Bedeutung. In weiteren Versuchen zur Amplifizierung und Klonierung der eichensassoziierten dsRNA sollte verschiedenartige DOP-Primer mit definierten 3'-Enden eingesetzt werden, um distinkte Banden zu erzeugen.

Die größte Menge an PCR-Produkten wurde unter Verwendung des Primers Bgl-Eco-RH 2 in Kombination mit einem alternativen DOP-PCR-Programm amplifiziert (Kap. 3.5.3). Für die ersten fünf Zyklen wurde die Annealingtemperatur abweichend vom ursprünglichen Protokoll nicht schrittweise von 30 °C auf 42 °C erhöht, sondern konstant bei 30 °C gehalten. Bei der Verwendung von DEPC-behandeltem, einfach demineralisiertem Wasser im Mastermix konnte eine Anreicherung der PCR-Fragmente, besonders im Bereich von 400-600 bp, gegenüber der Variante mit hochreinem, mehrfach demineralisiertem (MilliQ) Wasser beobachtet werden (Kap. 3.5.3). Als Ursache ist die unterschiedliche Ionenkonzentration anzunehmen. Der pH-Wert und die Ionenkonzentration beeinflussen die PCR. Kationen reduzieren durch die Anlagerung an das Desoxyribose-Rückgrat der DNA die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen DNA-Strängen, so dass die Anlagerung des Primers an die Matrize erleichtert wird (LÖFFERT et al., 1997; VOGEL & SIEBERT, 2002).

Alternativ zur DOP-PCR wurde die mit dem DOP-Primer Bgl-Eco-RH 2 synthetisierte cDNA in eine "klassische" Zweitstrangsynthese eingesetzt. Diese wurde bereits mehrfach für die Klonierung von viraler dsRNA aus holzigen Wirten beschrieben (JELKMANN et al. 1989, JELKMANN, 1995; MENG et al., 1998; ZHANG et al. 1998) und eignet sich besonders zur Charakterisierung von Viren, bei denen die Isolierung von Viruspartikeln oder ein serologischer Nachweis nicht möglich ist (JELKMANN et al., 1989). In der eigenen Arbeit konnte dsRNA aus Stieleiche mit dieser Methode partiell kloniert werden (Kap. 3.5.3). Basierend auf der bei dieser cDNA-Synthese einhergehenden geringen Menge an Template

im Vergleich zur RT-DOP-PCR, resultierte aus diesem Versuch auch eine geringe Ausbeute an Klonen. Aus fünf Versuchsansätzen gingen nur zwei Klone von 354 bp und 436 bp hervor. Es ist außerdem anzunehmen, dass es im Verlauf der cDNA-Synthese durch die notwendigen Fällungsschritte zu Verlusten kam. BENTHACK (2001) beispielsweise gelang es auch nach zahlreichen Ansätzen nicht, dsRNA aus Ebereschen über eine cDNA-Synthese zu klonieren. Neben Fällungsverlusten sieht die Autorin die unzureichende Denaturierung bzw. Rückfaltung der dsRNA als Hauptproblem an. In der eigenen Arbeit konnte durch die sofortige Überführung der hitzedenaturierten dsRNA auf flüssigen Stickstoff der Rückfaltung der dsRNA entgegengewirkt und somit dsRNA über die "klassische" Zweitstrangsynthese kloniert werden.

Unabhängig von der Probenherkunft und der Klonierungsstrategie konnten insgesamt drei Klone aus dsRNA von Stieleichen erhalten werden, die Identitäten von 61-64 % mit der Sequenz der RdRp des *Beet cryptic virus 3* (BCV 3) aufwiesen (Kap. 3.5.3, Kap. 3.5.5). Vom 5'-nahen Bereich eines der Klone wurde das spezifische Primerpaar Oak Cryp 1 abgeleitet und im RT-PCR-Verfahren zur Untersuchung von Eichenproben eingesetzt. Durch das abgeleitete Primerpaar war der eindeutige Nachweis dieser Sequenz in dsRNA-Proben aus symptomtragenden und symptomlosen Stieleichen möglich. In einer RT-PCR mit den RdRp-spezifischen Primern Oak Cryp 1 und den aus einem Agarosegel extrahierten dsRNA-Banden von 1,5 kb und 1,6 kb wurde ein eindeutiges PCR-Produkt mit der 1,6 kb Bande amplifiziert. Ein schwaches Produkt konnte jedoch ebenso in der 1,5 kb dsRNA-Bande amplifiziert werden. XIE et al. (1993) fanden heraus, dass die 1,6 kb-Bande von BCV 3 für die RdRp kodiert, während die 1,7 kb-Bande dem Hüllproteingen zugeordnet wird. Die 1,5 kb und 1,6 kb dsRNA-Banden aus Stieleiche im Agarosegel lagen sehr dicht beieinander und konnten daher möglicherweise nicht sauber voneinander getrennt ausgeschnitten werden. Dadurch kann es zur Erzeugung des RdRp-spezifischen PCR-Produktes in der 1,5 kb dsRNA-Bande gekommen sein. Es ist aber ebenfalls möglich, dass beide dsRNA-Banden für die RdRp kodieren, denn OSAKI et al. (1998) isolierten fünf dsRNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aus *Pyrus* ssp. und stellten fest, dass sie partiell annähernd die gleiche Aminosäuresequenz für eine RdRp kodierten.

Die RdRp-spezifischen PCR-Produkte ließen sich ebenso in Gesamt-RNA von Stieleichen über eine zusätzliche Nested-PCR amplifizieren (Kap. 3.5.4). Dieses Ergebnis bekräftigt die Vermutung, dass es sich bei den als Doppelbanden auftretenden dsRNA-Fragmenten aus symptomlosen und symptomtragenden Stieleichen um die genomische RNA eines kryptischen Virus handeln könnte. Es können jedoch ebenso dsRNA-Fragmente endogenen Ursprungs in Stieleichen vorliegen. Gestützt wird diese Annahme durch die ähnlich hohe Übereinstimmung der eichenassoziierten dsRNA-Sequenz zur dsRNA-Sequenz isoliert aus

Pyrus ssp. die ebenso eine Identität von 67 % zur RdRp des BCV 3 aufweist (OSAKI et al., 1998) (Kap. 3.5.3 und Kap. 3.5.5). Die Autoren diskutieren die Existenz von endogener dsRNA in *Pyrus* ssp., weil keine Viruspartikeln nachgewiesen werden konnten und die dsRNA in hoher Konzentration im pflanzlichen Gewebe vorlag.

Für den Ursprung der 2,0 kb/1,8 kb-Bande konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Erklärung gefunden werden. Möglicherweise liegt eine Mischinfektion von kryptischen Viren in Stieleichen vor. Vier dsRNA-Banden ähnlicher Größe, wie derjenigen aus Stieleichen wurden z.B. in BCV-infizierten Rübenkultivaren beschrieben (KASSANIS et al., 1977). Jüngere Untersuchungen zeigten, dass es sich dabei um eine Mischinfektion mit BCV 1 (2060 bp/1740 bp) und BCV 2 (1420 bp/1320 bp) handelt (ACOTTO & BOCCARDO, 1986; BOCCARDO et al., 1987; XIE et al. 1993). In Übereinstimmung zur Genomorganisation des BCV 3 kodiert die größere der dsRNA-Komponente für die RdRp und die kleinere für das Hüllprotein (ACOTTO et al., 1987). Zwischen den vier dsRNA-Komponenten bestehen jedoch keine signifikanten Sequenzhomologien (ANTONIOW et al., 1986; XIE et al. 1989; XIE et al. 1993). BCV 1 und BCV 2 können aber auch einzeln in Rübenkultivaren vorkommen (NATSUAKI et al., 1986; ANTONIOW et al., 1986; BOCCARDO et al., 1987). Es wäre möglich, dass die ca. 2,0 kb/1,8 kb-Banden in Stieleichen mit BCV 1 oder dem *Vicia cryptic virus* (VCV) (BLAWID et al., 2004) verwandt sind, welche ebenso dsRNA-Banden der Größen 2,0/1,8 kb aufweisen. Es sollten für die Untersuchung einer Mischinfektion in noch anzustellenden Versuchen aus den bekannten Sequenzen der kryptischen Viren spezifische Primer abgeleitet und in einer RT-PCR mit der 2,0/1,8 kb dsRNA aus Stieleichen eingesetzt werden. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass alle vier dsRNAs aus Stieleiche für eine RdRp kodieren, wie OSAKI et al. (1998) für *Pyrus* beschreiben, ist in RT-PCR-Analysen zu prüfen, ob sich mit den RdRp-spezifischen Oak Cryp-Primern in der 2,0/1,8 kb dsRNA-Bande ebenfalls ein spezifisches PCR-Produkt amplifizieren lässt.

Wie bereits erwähnt konnte im Anschluss an eine Nukleokapsidanreicherung nach KELLMANN et al. (2002) aus Blattmaterial symptomloser Stieleichen und Rindengewebe erkrankter Bäume ein Protein von etwa 54 kDa in einer SDS-PAGE dargestellt werden (Kap. 3.4.2). Dass es sich dabei möglicherweise um die große Untereinheit der Rubisco handelt, die eine ähnliche Größe aufweist (FRESHWATER et al., 1999), konnte ausgeschlossen werden. Das Rubisco-Protein ist in den Chloroplasten-Stroma lokalisiert (SMITH et al., 1997) und damit in grünen Pflanzenteilen in großen Mengen vorhanden. Das angereicherte Protein aus Stieleichen lag jedoch in Rindengewebe höher konzentriert als im Blattmaterial vor. Um 'Vegetative Storage Proteins' (VSP) bzw. 'Bark Storage Proteins' (BSP) kann es sich bei den angereicherten Proteinen aus dem Rindengewebe ebenfalls nicht handeln. Sie sind mit 38 kDa deutlich kleiner als die aus der Rinde von Stieleichen angereicherten Proteine. Sie

werden während des Winters verstärkt in Rinde und anderen überdauernden Organen als Stickstoffvorrat für den Beginn der Vegetationsperiode eingelagert (COOKE & WEIH, 2005).

Mit Hilfe der RT-PCR und dem Primerpaar Oak Cryp 1 konnte das spezifische Fragment der RdRp in den angereicherten Nukleokapsidfraktionen amplifiziert werden (Kap. 3.5.4). Das spricht für eine Assoziation des Proteins von etwa 54 kDa mit der RdRp-kodierenden RNA. Das errechnete Molekulargewicht der abgeleiteten Aminosäuresequenz stimmte mit 54,7 kDa ebenfalls mit der Größe dieses Proteins überein (Kap. 3.5.5).

RNA-abhängige RNA-Polymerasen wurden nicht nur in allen RNA-Viren, mit Ausnahme der Retroviren, die eine Reverse Transkriptase besitzen, sondern auch in Pflanzen nachgewiesen (SCHIEBEL et al., 1998; GOPALAKRISHNA, 1999). Für die Gruppen der ssRNA-Viren und dsRNA-Viren wurden sechs verschiedene hochkonservierte Motive beschrieben (POCH et al. 1989; MULLER et al., 1994; VON POELWJIK, 1997). In neueren Untersuchungen wurde das Prämotiv A in die Motive F1 bis F 3 unterteilt, so dass heute zwischen acht konservierten RdRp-Motiven unterschieden wird (RUTHIER & BRUENN, 1998; OSAKI et al., 2002; BRUENN, 2003), auf deren Basis sich Viren in verschiedene Superfamilien einteilen lassen. Diese sind am Aufbau funktionaler Domänen beteiligt. Für die abgeleitete Aminosäuresequenz des ORF der dsRNA-Sequenz aus Stieleiche, konnten die acht konservierten Motive der RdRp identifiziert werden (Kap. 3.5.5). Alle bisher bekannten Polymerasen sind ähnlich aufgebaut. Sie haben die Form einer rechten Hand und untergliedern sich in die 'thumb'-, 'palm'- und 'fingers'-Domänen. Die 'fingers'-und 'thumb'-Domäne unterscheiden sich in allen vier Polymerase-Familien. Die 'palm'-Domäne ist in allen Polymerasen hochkonserviert (STEITZ, 1999; BUTCHER et al., 2001) und deutet auf einen gemeinsamen Ursprung hin (KAMER & ARGOS, 1984; ARGOS, 1988; POCH et al., 1989; DELARUE et al. 1990). Sie beinhaltet die Sequenzmotive A, B und C (GORBALENYA et al., 2002). Motiv A (DX₄₋₅D) formt einen β -Strang und besitzt zwei Asparaginsäure-Reste, die durch 4-5 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Motiv C (XDD) besitzt ein Asparaginsäure-Dipeptid, wird durch hydrophobe Bereiche flankiert und weist eine 'beta-hairpin'-Struktur auf. Die Asparaginsäure-Reste binden divalente Mangan- bzw. Magnesium-Ionen und sind entscheidend für die Katalyse. Motiv B formt eine lange α -Helix und ist in vielen RdRps konserviert. Es enthält einen Asparaginsäure-Rest, der die Unterscheidung zwischen dNTPs und NTPs steuert und damit festlegt, ob RNA oder DNA synthetisiert wird (GORBALENYA et al., 2002).

Der aus dem Vergleich verschiedener viraler und pflanzlicher RdRp-Sequenzen im Bereich der Motive F1 bis E resultierende phylogenetische Stammbaum zeigte die höchste Verwandtschaft der abgeleiteten RdRp-Aminosäure-Sequenz aus dsRNA von Stieleichen zur RdRp der Partitiviren. Neben der RdRp des BCV 3 und der RdRp pilzpathogener Viren (AHN

& LEE, 2001; OSAKI et al., 2002) weisen auch die RdRp-kodierenden dsRNAs aus *Pyrus* ssp. (OSAKI et al., 1998) und *Bryopsis citricola* die höchste Identität zu dieser Virusgruppe auf (KOGA et al., 2003) (Kap. 3.5.5). Die Gruppierung zur dsRNA aus *Bryopsis citricola* deutet erneut auf den endogenen Charakter der 1,5/1,6 kb-dsRNA-Banden in Stieleichen hin, denn KOGA et al. (1998) hatten die dsRNA-Fragmente von 1,7 bis 2,2 kb aus den Mitochondrien von *Bryopsis*-Algen isoliert und konnten aufgrund diesen Ursprungs eine Kontamination mit einem kryptischen Virus ausschließen. Die Autoren nehmen wegen der einfachen Genomstruktur der dsRNA den Verlust des Transportproteingens im Verlauf der Evolution an und führen darauf die Plasmid-ähnliche Natur der endogenen dsRNA zurück.

DsRNA-Replikons kommen in Protozoen, Insekten, Pilzen und höheren Pflanzen vor (WANG & WANG, 1991; GHABRIAL, 1998; MIYAZAKI et al., 1996). Auf Basis der Morphologie und genomischen Struktur können sie in fünf Gruppen eingeteilt werden: Hochmolekulare dsRNA >10 kb wurde in Pilzen und Pflanzen gefunden. Die pilzpathogenen dsRNAs werden als Hypoviren klassifiziert (HILLMANN et al., 1994), während pflanzliche dsRNAs >10 kb, die aus *Oryza sativa*, *Vicia faba* und *Phaseolus vulgaris* isoliert wurden den Endoviren zugeordnet werden (FUKUHARA, 1999; GIBBS et al., 2000).

Darüber hinaus sind 2,3-3,6 kb lange dsRNAs in Pilzen als Narnaviren bekannt (WICKNER et al., 2000). Ihre RdRps weisen die höchste Ähnlichkeit zu den Bakteriophagen auf. Die Vertreter der Totiviren aus Pilzen und Protozoen besitzen ein einziges dsRNA-Molekül von 4,6-7,0 kb, das über zwei oder drei ORFs das Hüllprotein und die RdRp kodiert (WICKNER, 1996).

Die dsRNA-Sequenz aus Stieleiche, ist wie die aus *Pyrus* ssp. und *Bryopsis citricola* mit den Partitiviren verwandt, die isometrische Partikeln mit zwei segmentierten dsRNA-Strängen von 1,4 bis 3,0 kb ausbilden (GHABRIAL et al., 1994a). In den eigenen Untersuchungen konnten ebenfalls isometrische Partikeln von etwa 30 nm in Adsorptionspräparaten symptomtragender Stieleichen nachgewiesen werden (Kap. 3.3). ISHIHARA et al. (1992) isolierten endogene dsRNA von 2,0 kb aus 25 nm großen Partikeln, die sie aus Chloroplasten von *Bryopsis* ssp. angereichert hatten. Kryptische Viren verpacken ihre dsRNA in Partikeln, die etwa 29-32 nm bzw. 37-38 nm groß sind (BOCCARDO et al., 1987). Anhand der gezeigten isometrischen Partikeln in Stieleichen kann also nicht geschlussfolgert werden, inwieweit ein kryptisches Virus oder ein endogenes dsRNA-Replikon vorliegt. Eine Assoziation dieser Partikeln zur Stieleichen-dsRNA konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Für zukünftige Untersuchungen zur möglichen Verbreitung von Partitiviren in Stieleichen müssen effiziente Reinigungsverfahren entwickelt und zur Untersuchung verschiedener Gewebearten eingesetzt werden. Um das Vorkommen dieser Viren nachweisen zu können, müssten Viruspartikeln auch in symptomfreien Pflanzenmaterial

elektronenoptisch dargestellt und daraus dsRNA isoliert werden. Im RT-PCR-Verfahren könnten diese dann mit den spezifischen Primern getestet werden.

Für den möglichen pflanzlichen Ursprung der eichenassoziierten dsRNA sprechen die Nested-PCR-Analysen mit den spezifischen Primern Oak-Cryp 3 unter Verwendung von Gesamt-RNA und DNA verschiedener krautiger und holziger Pflanzen. Das spezifische Fragment ließ sich ebenfalls in Gesamt-RNA von *Sambucus nigra* und *Chenopodium quinoa* sowie in Gesamt-RNA und genomischer DNA von *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' amplifizieren. Über einen Bereich von 610 bp stimmten sie zu 99 % mit der Sequenz aus dsRNA von Stieleichen überein (Kap. 3.5.4). Durch Negativkontrollen mit Wasser konnte eine Kontamination der PCR-Reagenzien ausgeschlossen werden.

In früheren Untersuchungen wurde bereits durch die Hybridisierung von zellulärer dsRNA mit Zellkern-DNA für *Phaseolus vulgaris* (WAKARCHUK & HAMILTON, 1985, 1990), *Vicia faba* (TURPEN et al., 1988), *Oryza sativa* (WANG et al., 1990) und *Persea* ssp. (COOK et al., 1994) ein gemeinsamer Ursprung der verschiedenen Nukleinsäuren in Pflanzenzellen vermutet. ISHIHARA et al. (1992) postulieren dafür den Transfer von partiellen Basensequenzen zellulärer dsRNAs zu Zellkern-DNA. WAKARCHUK & HAMILTON, (1985) sowie COOK et al. (1994) gehen von einem Ursprung der dsRNA in der genomischen DNA der Wirtspflanze aus und FRAENKEL-CONRAT (1983) erklären den genomischen Ursprung von dsRNA in Pflanzen über die Transkription von zelleigenen RNA-Molekülen durch RdRps.

DNA-kodierte, pflanzeigene RdRp-Sequenzen, konnten bereits in verschiedenen Pflanzenarten nachgewiesen werden. Auch wenn keine Identitäten zu bisher beschriebenen pflanzlichen RdRps wie der in den Aminosäurevergleich aufgenommenen *Nicotiana* und *Solanum* gefunden wurden (Kap. 3.5.5) besteht die Möglichkeit, dass die RdRp-Sequenz aus Stieleichen im pflanzlichen Genom vorliegt, worauf die Amplifikation des spezifischen Fragmentes in genomischer DNA von Tabak hindeutet. Der Replikationszyklus und die Entstehung der nachgewiesenen dsRNA könnten wie folgt erklärt werden:

Das im Zellkern in das pflanzliche Genom integrierte RdRp-Gen wird zur mRNA transkribiert und anschließend im Zytoplasma an den Ribosomen zum funktionellen Protein (RdRp) translatiert, wie es auch für eukaryotische RdRps beschrieben wird (GOPALAKRISHNA, 1999). Diese kann ihre eigene mRNA erkennen, dsRNA-Intermediate bilden und sich so semikonservativ wie ssRNA(+)-Viren replizieren (RYBICKI, 2000). Es entstehen dsRNA-Replikons, die sich selbstständig vermehren und innerhalb der Zellen anreichern können (KOGA et al., 1998, 2003). In dieser Form können sie in wesentlich höherer Konzentration vorliegen und demzufolge in dsRNA und in den angereicherten Nukleokapsiden bereits in einer RT-PCR amplifiziert werden (Kap. 3.5.4). Im pflanzlichen Genom hingegen kommt das RdRp-Gen vermutlich nur als Einzelkopie vor und kann erst in einer Nested-PCR nachgewiesen werden (Kap. 3.5.4). Um diese Hypothese zu bestätigen, sollte in

nachfolgenden Arbeiten geprüft werden, ob sich das RdRp-spezifische Fragment in einer PCR mit anschließender Nested-PCR auch in genomischer DNA aus Stieleichen amplifizieren lässt. Zudem könnte versucht werden, dsRNA aus *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun', *Chenopodium quinoa* und *Sambucus nigra* zu extrahieren und diese mit den RdRp-spezifischen Primern zu testen. Es ist möglich, dass solche dsRNA-Replikons in allen Pflanzen nachzuweisen sind.

Als Funktion der pflanzeigenen RdRp-Sequenz in Stieleichen ist die Einbindung in das 'Post transkriptionelle Gene-Silencing' (PTGS) denkbar. Dieser Mechanismus ist für viele Pflanzen bekannt. SCHIEBEL et al. (1998) isolierten erfolgreich die RdRp aus *Lycopersicon esculentum* und stellten eine steigende RdRp-Aktivität in Viroid-infizierten Tomatenpflanzen und eine Zunahme der RdRp-kodierenden mRNA fest. Die Autoren diskutieren die Rolle der pflanzeigenen RdRp bei der RdRp-abhängigen Auslösung des 'Post transkriptionellen Gene-Silencing' (PTGS). Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften belegen, dass die RdRp ssRNAs und demzufolge auch virale mRNAs als Template benutzt, um copy (c)RNAs zu synthetisieren, die den 'Silencing'-Prozess aktivieren. Interaktionen zwischen mRNA und der cRNA führen zur Ausbildung einer dsRNA-Struktur, die durch dsRNA spezifische RNasen zerstört werden (DOUGHERTY & PARKS, 1995; SCHIEBEL et al., 1998).

Der Ursprung eukaryotischer RdRps ist bisher nicht bekannt. Ausgehend von einer RNA-Welt, könnten alle Polymerasen aufgrund ihrer Sequenzidentitäten von einer "Ur-RdRp" abstammen. IYER et al. (2003) nehmen an, dass RdRps im Verlauf der Evolution in das pflanzliche Genom integriert wurden. Sie können aus bestimmten zellulären Lebensformen entfernt und später durch Bakteriophagen wieder in eukaryotische Genome eingeführt worden sein. SCHIEBEL et al. (1998) stellten zwischen Vertretern der *Solanaceae* (*Lycopersicon*, *Petunia*, *Nicotiana*) *Leguminosae* und *Poaceae* (*Vigna*, *Triticale*) RdRp-Sequenzidentitäten von 70 – 95 % über 93 Aminosäuren im Bereich der Sequenzmotive F1 bis F3 am 5'-Ende der RdRp-Sequenz fest. In der eigenen Arbeit wurden auf Nukleotidebene über 604 bp ebenso wie in der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz am 5'-Ende der RdRp Identitäten von 99 % zwischen Stieleichen, *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun', *Chenopodium quinoa* und *Sambucus nigra* gefunden. Ähnliche RdRp-Sequenzen fanden SCHIEBEL et al. (1998) in Hefe (*Schizosaccharomyces pombe*) und Nematoden (*Caenorhabditis elegans*). WAKARCHUK & HAMILTON (1985) vermuten ebenfalls Sequenzhomologien zwischen Prokaryoten und Eukaryoten, da die dsRNA aus *Phaseolus vulgaris* mit einem 3 kb großen Fragment aus *E. coli* hybridisierte. Diese Beobachtungen unterstützen die Theorie eines gemeinsamen Ursprungs aller Polymerasen, vor der Entstehung der Eukaryoten. Geringere Sequenzkonservierung in RdRps von Pflanzen fanden SCHIEBEL et al. (1998) im 3'-terminalen Bereich. In weiteren Untersuchungen sollten daher Primer in Nähe des 3'-Endes der eichenassoziierten RdRp abgeleitet werden, um zu

prüfen, ob in diesem Bereich möglicherweise Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Pflanzenarten festgestellt werden können.

Auch für dsRNA-Viren wird ein gemeinsamer Ursprung der RNA abhängigen RNA-Polymerasen angenommen. Die hohe Identität zwischen nichtinfektiösen dsRNA-Viren in Pilzen und Hefen erklärt BRUENN (1993) durch einen gemeinsamen Ursprung in einem nichtinfektiösen Virus eines einzelnen Zelltypus. Dieser Zelltyp hat sich in Protozoen und Pilzen verbreitet. Auch MERTENS (2004) geht aufgrund der strukturellen und funktionalen Ähnlichkeiten vieler dsRNA-Viren aus unterschiedlichen Organismen von einem gemeinsamen Ursprung aus. Gleiches nahmen BAMFORD et al. (2002) an, als sie in Strukturanalysen Parallelen von Reo-Toti- und Birnaviren zur Reo- Φ 6 Linie fanden. Neue Daten lassen einen frühen evolutionären Ursprung vor der Teilung von Tieren und Pflanzen vermuten (BRUENN, 1993). Die mögliche Verbindung zum nicht infektiösen Pflanzenvirus BCV 3 erklärt der Autor durch eine möglicherweise frühere Abzweigung der Pflanzen von der Linie, die zu den Protozoen und Pilzen führte. Die Existenz von dsRNA-Viren vor der Teilung von Pilzen und Protozoen nimmt GHABRIAL (1998) ebenso an, da ein Totivirus in filamentösen Pilzen charakterisiert wurde, der näher verwandt zu Protozoen-Totiviren ist als zu Hefe-Totiviren.

Der scheinbar gemeinsame Ursprung, die einfache Genomorganisation sowie die hohen Übereinstimmungen der RdRps untermauern die Theorie, von einer zellulären selbstreplizierenden mRNA als Ursprung der Totiviren. Partitiviren weisen eine ebenso einfache Genomstruktur auf, Hüllprotein- und RdRp-Gen liegen jedoch auf separaten dsRNA-Segmenten. Aufgrund der RdRp-Ähnlichkeiten ist anzunehmen, dass die Partitiviren aus den Totiviren hervorgingen.

Ein Charakteristikum von endogenen dsRNA-Replikons ist die gleichmäßige Konzentration der dsRNA in allen Gewebeteilen, die durch die horizontale Verbreitung erreicht wird. Weshalb in Knospen und Rinde von Stieleichen signifikant höhere dsRNA-Konzentrationen vorliegen (Kap. 3.5.2), konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Um die RdRp-Sequenz aus Stieleiche eindeutig den dsRNA-Fragmenten zuordnen zu können, wurden Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonden hergestellt und in die Northern-Hybridisierung sowohl mit dsRNA als auch mit Gesamt-RNA aus Stieleichen eingesetzt. Weder im Northern-Blot mit denaturierten Agarosegelen noch mit denaturierenden Formaldehyd- bzw. Glyoxalgelen konnten Signale erzeugt werden. Auch im Spotttest reagierte die dsRNA aus verschiedenen Stieleichengeweben nicht mit den Sonden. Ebenso wie bei der RT-DOP-PCR bzw. cDNA-Synthese wird sowohl die unzureichende Denaturierung der dsRNA als auch die geringe Konzentration der dsRNA bzw. Gesamt-RNA

als Ursache angenommen. Der spezifische Nachweis in dsRNA und Gesamt-RNA konnte nur mit der RT-PCR erfolgen. Diese Nachweisverfahren gilt als das Sensitivste. Falsch positive Ergebnisse durch unspezifische Primerbindungen können bei diesem Extraktionsverfahren auftreten und sind als nachteilig zu werten (HENGEN, 1995; JAAKOLA et al., 2001). In zukünftigen Untersuchungen könnten für das Screening rekombinanter Klone in einer Kolonie-Filter-Hybridisierung zunächst direkt markierte dsRNA-Sonden z. B. mit Hilfe des "Enhanced-Chemiluminescence" (ECL)-System der Fa. Amersham hergestellt werden. Für die Synthese Dig-markierter RNA-Sonden aus den rekombinanten Klonen wird eine *In vitro*-Transkription empfohlen, die wiederum in eine Northern-Hybridisierung mit dsRNA bzw. Gesamt-RNA eingesetzt werden können. BENTHACK (2001) gelang es so, virusspezifische RNA in Gesamt-RNA symptomtragender Ebereschen nachzuweisen.

Northern-Hybridisierungen auf RNA-Basis sind besonderes in sekundärstoffreichen Pflanzen schwierig (JAAKOLA et al., 2001). Phenolische Verbindungen bilden kovalent gebundene Quinonen in oxidierte Form, welche die Nukleinsäuren binden (LEVI et al., 1992). Als alternative Methode schlagen JAAKOLA et al. (2001) das cDNA-Blotting vor. Dafür wird die RNA sofort nach der Isolierung in cDNA revers transkribiert, elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Den Autoren gelang es dadurch das Chalcone-Synthase Gen in Gesamt-RNA von Blaubeeren nachzuweisen.

Das symptomverursachende Agens für die Ringflecken, Scheckungen und mosaikartigen Blattverfärbungen in Stieleichen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Zwei Tobamovirus-Isolate konnten aus Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken isoliert und charakterisiert werden. Diese werden jedoch nicht als Erreger der Stieleichenringfleckigkeit angenommen, da sie bisher keine charakteristischen Symptome nach Rückübertragung auf Eichen induzierten. Partitiviren, auf deren Vorkommen in Stieleichen die Analysen der dsRNA hindeuten, verursachen in Pflanzen normalerweise keine Symptome. Nur in wenigen Fällen kann eine Infektion mit kryptischen Viren mit der Ausprägung von Symptomen einhergehen. So konnten KASSANIS et al. (1978) schwache Chlorosen an BCV-infizierten Zuckerrüben beobachten. Eine Gelbfärbung der Blattspreite wurde an RYEV-infizierten Radieschenkulturen festgestellt (NATSUAKI et al., 1983).

Bei der Ringfleckigkeit der Stieleiche kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Symptome ausschließlich durch ein solches putatives Partitivirus oder durch das Zusammenwirken mit biotischen und abiotischen Standortfaktoren verursacht werden. Anhand von dsRNA-Analysen von Bäumen gleicher Herkunft konnte gezeigt werden, dass bei gleichen Standortbedingungen die gleichen dsRNA-Banden aus symptomtragenden und symptomlosen Stieleichen isoliert werden können (Kap. 3.5.2). Wie bereits erwähnt, ist es jedoch möglich, dass die Symptome in Abhängigkeit der Standortvoraussetzungen variieren

können (BÜTTNER & FÜHRLING, 1993), was anhand der beobachteten, verstärkt gelbgrünen Ringflecken und Chlorosen an Stieleichenblättern des Standortes Sachsen, FA Dresden-Nord bestätigt werden konnte (Kap. 3.1).

Aufgrund der von BARNETT (1971), NIENHAUS (1975) und FÜHRLING (1994) gezeigten Pfropfübertragbarkeit der Eichenringflecken, -scheckungen und -mosaiks sind diese als Symptome infektiösen Ursprungs zu werten. BÜTTNER & FÜHRLING (1993) beschreiben die Pfropfübertragung als einfaches und sicheres Nachweisverfahren für Viren in Forstgehölzen. Es muss daher angenommen werden, dass neben einer Kontamination mit Partitiviren eine Infektionskrankheit bisher unbekannter Ursache vorliegt. So konnten in Untersuchungen zu Viruserkrankungen in Poinsettien (*Euphorbia pulcherima*) isometrische Partikeln beobachtet werden, die in Verbindung mit *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) mosaikartige Aufhellungen an Blättern erkrankter Pflanzen verursachten. Diese Partikeln konnten ebenso aus gesunden Pflanzen isoliert werden und wurden als *Poinsettia cryptic virus* (PoiCV) identifiziert (BERTACCINI et al., 1996).

Ein infektiöses RNA-Virus in Stieleichen vorausgesetzt, müsste sich mindestens eine weitere hochmolekulare dsRNA-Bande aus erkrankten Stieleichen nachweisen lassen. In den eigenen Untersuchungen konnten ausschließlich aus Probenmaterial von Stieleichen mit virusverdächtigen Symptomen hochmolekulare dsRNA-Banden > 3,0 kb nachgewiesen werden. Aus dem Rindenextrakt von Stieleichen mit chlorotischen Ringflecken wurde eine hochmolekulare dsRNA mit einer Segmentlänge von ca. 3,5 kb isoliert, die jedoch in Knospengewebe und Blattmaterial derselben Bäume nicht auftrat (Kap. 3.5.2). Des weiteren wurde in einer Mischprobe von Blattmaterial erkrankter Stieleichen eines niedersächsischen Standortes eine hochmolekulare dsRNA von etwa 5 kb, sowie reproduzierbar eine zusätzliche dsRNA von ca. 1,6 kb nachgewiesen (Kap. 3.5.2). Aus Blattmaterial des folgenden Probenahmejahres konnten diese dsRNA-Segmente nicht mehr isoliert werden. Ursache ist vermutlich die Heterogenität des Blattmaterials der verwendeten Mischproben. Im Untersuchungsjahr 2003 waren etwa doppelt so viele Stieleichen mit Symptomen in diesem Bestand zu beobachten als im darauf folgenden Jahr. Obwohl ausschließlich Blätter mit Symptomen verwendet wurden, kann eine mögliche Virusfreiheit des Blattmaterials nicht ausgeschlossen werden. Von Viren in Gehölzen ist bekannt, dass deren Verteilung im Gehölz sehr inhomogen ist (BITTERLIN et al., 1984). FÜHRLING (1994) gelang es ebenso nur aus vereinzelt Blattproben hochmolekulare dsRNA von >3,4 kb zu isolieren. Die Autorin begründet dies nicht nur mit dem verwendeten Pflanzenmaterial sondern auch mit dem Zeitpunkt der Probenahme. Ein Zusammenhang zwischen dem Probenahmezeitpunkt und den hochmolekularen dsRNA-Banden konnte in den eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden (Kap. 3.5.2). Außerdem wurden die Probenahmen am niedersächsischen

Standort in den beiden aufeinander folgenden Probenahmejahren in der gleichen Kalenderwoche durchgeführt (Tab. A1, Anhang 4).

Die Verschiedenheit der hochmolekularen dsRNA-Strukturen (Kap. 3.5.2), der virusverdächtigen Partikeln (Kap. 3.4.1) und der beobachteten Blattsymptome (Kap. 3.1), sowie das sporadische Auftreten von Tobamoviren in erkrankten Stieleichen (Kap. 3.4.3) lassen das Vorkommen von verschiedenen Mischinfektionen in Stieleichen vermuten.

In den eigenen Untersuchungen konnte über die Isolierung und Klonierung von dsRNA kein Hinweis auf ein symptomverursachendes Agens gefunden werden. Die möglicherweise endogenen dsRNAs von ca. 1,6 kb/1,5 kb und ca. 2,0/1,8 kb werden auch in zukünftigen Untersuchungen die Isolierung und Charakterisierung putativer viraler dsRNA erschweren, da diese im Vergleich zu hochmolekularen dsRNAs durch eine höhere Konzentration vordergründig auftreten.

Es bleibt zudem nicht auszuschließen, dass eine Infektion mit DNA-Viren vorliegt, welche mit der Methode der dsRNA-Isolierung nicht nachgewiesen werden können (DODDS, 1993). Auch wenn in den bisherigen Arbeiten den Symptomen keine Viruspartikeln zugeordnet werden konnten, sollte in folgenden Arbeiten eine Kontamination der Stieleichen mit DNA-Viren oder auch Viroiden geprüft werden. Zu den ökonomisch bedeutendsten Obstgehölzen, an denen Viroide weltweit Schäden verursachen, gehören Orangen- und Zitronenbäume (*Citrus viroid III, IV; Citrus bent leaf viroid, Citrus exocortis viroid*), der Avocado Baum (*Avocado sunblotch viroid*), sowie Weinreben (*Grapevine yellow speckle viroid 1, Hop stunt viroid*) und die Kokospalme (*Coconut-cadang-cadang-viroid*) (POLIVKA et al., 1996; WAN CHOW WAH & SYMONS, 1999; SCHNELL et al., 2001; MALFITANO et al., 2005). Die Symptome, die von Viroiden verursacht werden, ähneln denen der Viren. Mischinfektionen von Viren und Viroiden wurden in *Malus*, *Pyrus* und *Prunus* nachgewiesen (LORETI et al., 1998; HASSAN et al., 2004; BOUANI et al., 2004). Zu den pflanzenpathogenen DNA-Viren gehören Vertreter der Gemini-, Nano- und Badnaviren (BÜCHEN-OSMOND, 2003). Als Gehölzpathogene sind das *Cocoa swollen shoot virus* (CSSV) in *Theobroma* (CILAS et al., 2005; MULLER & SACKKEY, 2005) und das *Rubus yellow net virus* (RYNV) in *Rubus* bekannt (JONES et al., 2004).

Obwohl in europäischen Forstgehölzen bisher nicht von Infektionen induziert durch Viroide bzw. DNA-Viren berichtet wurde, ist eine potentielle Vektorübertragbarkeit vorausgesetzt (MINK, 1993; BRUNT et al., 1996; BÜCHEN-OSMOND, 2003) davon auszugehen, dass sich diese in Forstbeständen ausbreiten könnten. In zukünftigen Untersuchungen zur Ringfleckigkeit der Stieleiche sollte mit Hilfe von Virusaufreinigungsverfahren für DNA-Viren, wie für das *Abutilon mosaic bigeminivirus* (AbMV) (ABOUZID & JESKE, 1986) oder das *Banana bunchy top virus* (THOMAS et al., 1991), versucht werden solche Viren anzureichern. Ebenso könnte der Nachweis von DNA-Viren über eine Ionenaustauschchromatographie erfolgen, die beispielsweise HARPER et al. (2003) zur Reinigung des *Petunia vein clearing virus*

(PVCV) einsetzen. Eine mögliche Viroidinfektion in Stieleichen könnte mit Hilfe einer R-PAGE (REISNER, 1987; FAKHFAKH et al., 2002; JEFFRIES & JAMES, 2005) oder der Northern-Hybridisierung (WAN CHOW WAH & SYMONS, 1999) diagnostiziert werden. Sofern sich Primer für bekannte Viroide ableiten lassen ist deren Nachweis auf Basis einer RT-PCR mit Nukleinsäureextrakten möglich. [ELLEUCH et al. (2003) schlagen für die Extraktion der Nukleinsäuren die Verwendung eines Hochsalz-Puffers in Kombination mit einer partiellen Reinigung durch nicht-ionische Cellulose vor.]

Es ist nahe liegend, dass auch Eichen Virusinfektionen aufweisen; alle Wege der Evolution sprechen dafür. Es ist nicht ungewöhnlich, dass Viren in Gehölzen schwer oder unregelmäßig nachweisbar sind. Die Instabilität der Viruspartikeln, der geringe Virustiter und der hohe Gehalt an pflanzlichen Sekundärstoffen erschweren die Diagnose. Zum heutigen Forschungszeitpunkt steht zwar ein weites Methodenspektrum auf serologischer und molekularbiologischer Basis für den Nachweis von Viren zur Verfügung, da diese Verfahren in der Regel jedoch nicht für die Analyse von Proben aus Gehölzen entwickelt wurden, führen deren Anwendung bei der Isolierung/Charakterisierung von viralen Erregern aus Stieleiche häufig zu unterschiedlichen Ergebnissen und erschweren die Reproduzierbarkeit erheblich.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von 2001 bis 2004 jährlich visuelle Bonituren von Stieleichenbeständen durchgeführt, in denen eine stetige Zunahme der virusverdächtigen Symptome in Nord- und Mitteldeutschland gezeigt werden konnte. Das Auftreten der charakteristischen Symptome an Stieleichen in Sachsen (FA Dresden-Nord) lässt vermuten, dass die Erkrankung auch im Osten und Süden des Landes weit verbreitet ist. Drei unterschiedliche Symptome konnten an den Stieleichen beobachtet werden: chlorotische Ringflecken z. T. mit distinkten nekrotischen Läsionen, Scheckungen und mosaikartige Blattverfärbungen. Etwa 90 % aller erkrankten Stieleichen wiesen chlorotische Ringflecken auf.

Elektronenoptisch konnten in Blatthomogenaten der erkrankten Stieleichen Partikeln unterschiedlicher Morphologie in geringer Konzentration dargestellt werden, die durch verschiedene Aufreinigungsverfahren angereichert wurden. Mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation im Anschluss an eine Vorklärung durch Bentonit und eine PEG-Fällung konnten aus zwei Blattproben mit chlorotischen Ringflecken stäbchenförmige Viruspartikeln mit einer Länge von ca. 450 nm isoliert und auf krautige Indikatoren übertragen werden. Nach einem ELISA-Test wurden diese der Gattung der Tobamoviren zugeordnet. In einer RT-PCR mit Hüllprotein- bzw. Transportproteinsequenz-spezifischen Primern konnte ein *Tobacco mosaic virus* (TMV)- und ein *Tomato mosaic virus* (ToMV)-Isolat identifiziert werden. Rückübertragungsversuche auf Eichensämlinge waren nicht erfolgreich. Zusätzlich wurden in verschiedenen Blattproben sowohl durch Differentialzentrifugation, als auch durch Zonalzentrifugation über ein Zuckerkissen isometrische Partikeln von 30-40 nm angereichert, die jedoch nicht mechanisch übertragen werden konnten. Eine Infektion der Stieleichen mit dem *Cherry leaf roll virus* (CLRV) konnte nach Durchführung von ELISA und RT-PCR mit CLRV-spezifischen Primern ausgeschlossen werden. Untersuchungen mit spezifischen Primern für den viralen Erreger der Ebereschenringfleckigkeit zeigten, dass die Ringfleckigkeit der Stieleichen nicht von diesem Erreger verursacht wird, obwohl erkrankte Individuen beider Baumarten häufig vergesellschaftet auftreten.

Über die Isolierung und Charakterisierung von dsRNA wurde eine alternative Methode zur Identifizierung des Erregers der chlorotischen Ringflecken in Stieleichen geprüft. Damit konnte aus Rindengewebe, Knospen und Blättern aller untersuchten Eichenproben - sowohl aus symptomlosen als auch aus Stieleichen mit virusverdächtigen Symptomen – die gleiche dsRNA isoliert werden. Die Segmentlänge der dsRNA betrug ca. 1.5/1.6 kb und 1.8/2.0 kb. Sowohl die charakteristische Größe der Banden, als auch das Auftreten als Doppelbande und das Vorliegen in symptomlosen Stieleichen deuteten auf eine Infektion mit kryptischen Viren hin, die keine Symptome in ihren Wirtspflanzen verursachen. Mit Hilfe der RT-DOP-PCR und Zweitstrangsynthese gelang es, Teile des 1.5/1.6 kb dsRNA-Molekül von drei

verschiedenen Proben in *E. coli* zu klonieren und Abschnitte der Nukleinsäuresequenz zu erhalten. Alle drei Sequenzen zeigten eine Übereinstimmung von 60-70 % zur Nukleinsäuresequenz der RNA 2 des *Beet Cryptic Virus 3* (BCV 3). Die Nukleinsäuresequenz, bestehend aus drei überlappenden Klonen, enthielt einen partiellen offenen Leserahmen von 1437 Nukleotiden der ein Polyprotein von 479 Aminosäuren kodierte und eine Identität von 56 % zur RdRp (RNA 2) des BCV 3 aufzeigte. Der spezifische Nachweis der eichenassoziierten dsRNA-Sequenz gelang mittels RT-PCR sowohl in dsRNA-Proben verschiedener Stieleichen, als auch in Nukleokapsidanreicherungen aus symptomlosen Eichenblätter und Rinde einer erkrankten Stieleiche. In einer Nested-PCR konnte diese Sequenz jedoch nicht nur in Gesamt-RNA von Stieleichen, sondern auch in Gesamt-RNA von gesunden Pflanzen, wie *Sambucus nigra*, *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun', *Chenopodium quinoa* und aus DNA von *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' nachgewiesen werden. Phylogenetische Vergleiche mit ausgewählten RdRp's viralen und pflanzlichen Ursprungs zeigten die engste Verwandtschaft der Stieleichen-dsRNA-Sequenz zu den Partitiviren, zu denen sich neben BCV 3 auch die endogene dsRNA aus *Pyrus* und aus Chloroplasten von *Bryopsis* gruppiert. Diese Erkenntnisse lassen in der charakteristischen Doppelbande von 1.5/1.6 kb das Vorliegen einer endogenen dsRNA vermuten, die vermutlich nicht als Verursacher der chlorotischen Ringfleckigkeit an Stieleichen in Frage kommt.

In Rindengewebe einer erkrankten Stieleiche vom Standort Berlin-Grünwald, RFö Dachsberg konnte ein zusätzliches dsRNA-Fragment von 3,5 kb nachgewiesen werden. Blätter mit chlorotischen Ringflecken und distinkten Läsionen vom Standort Niedersachsen, RFö Hopels zeigten zusätzliche Fragmente von 5,0 kb und 1,7 kb. Möglicherweise deuten die hochmolekularen dsRNA-Fragmente auf das Vorkommen weiterer symptomverursachender Viren in Stieleichen hin.

Summary

Within this study oak populations were surveyed for viruslike symptoms on leaves throughout Germany from 2001 to 2004. Ratings revealed that viruslike symptoms on oaks in north and central Germany are increasing. The wide-spread occurrence of these characteristic symptoms in oaks in Saxony suggest a further distribution in the eastern and southern part of the country. Three different types of symptoms were observed in common oak: chlorotic ringspots, mottling and mosaic. More than 90 % of all affected oak trees showed chlorotic ringspots.

A low concentration of different viruslike particles could be detected by electron microscopy in sap of symptomatic oak leaves. Particles were concentrated using several methods. Rod-shaped particles with a length of 450 nm were isolated from two different samples of leaves with chlorotic ringspots by differential centrifugation following preliminary sedimentation with bentonite and PEG precipitation. Purified particle preparations were successfully used to infect herbaceous indicator plants. Virus isolates recovered from these two different oak samples in indicator plants were identified by ELISA and RT-PCR of the coat and movement protein nucleotide sequences to be *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Tomato mosaic virus* (ToMV). Back-inoculation to oak seedlings failed. Additionally isometric particles (30-40 nm) were isolated from various samples of oak leaves by differential as well as horizontal centrifugation on a sucrose gradient, but it was not possible to transmit these partially purified virus preparations to common herbaceous indicator plants. Infection of oaks with *Cherry leaf roll virus* (CLRV) was excluded by ELISA and RT-PCR. Experiments using specific primers showed that ringspots of oaks are not caused by the same agent as the ringspots in European mountain ash, although diseased trees of both species often appear in close proximity in forest stands in Germany.

As an alternative approach to identify putative viruses infecting symptomatic oaks the isolation and characterisation of double-stranded RNAs (dsRNA) was evaluated. The same dsRNA was extracted from leaves, bark and bulbs of common oak displaying chlorotic ringspots and from leaves lacking symptoms. DsRNA molecules of approximately 2.0 kb, 1.8 kb, 1.6 kb and 1.5 kb were repeatedly detected. The occurrence of double bands, their characteristic size and the existence in asymptomatic oak trees indicated the occurrence of cryptic viruses which are generally considered not to induce any apparent symptoms in their host plants. The nucleotide sequence of the dsRNA was partially characterised by reverse transcription degenerated oligonucleotide primed (DOP)-PCR and cDNA cloning. Parts of three dsRNA samples extracted from symptomatic leaves of various stands in Germany were cloned and sequenced using this method. All three fragments showed nucleotide sequence identities of 60-70 % with RNA 2 of *Beet cryptic virus 3* (BCV 3). The nucleotide sequence consisting of three overlapping clones was found to contain a partial open reading frame of

1437 nt encoding for a putative polypeptide of 479 amino acids. The deduced amino acid sequence revealed identity of 56 % with the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of BCV 3. A RT-PCR with specific primers showed that the coding region of the RdRp protein was associated with the 1.5 kb and 1.6 kb dsRNA band. PCR amplification of the RdRp coding fragment was possible using a number of different dsRNA samples as well as concentrated nucleocapsid preparations. The same sequence was amplified by Nested-PCR not only from total RNA extracted from symptomatic and asymptomatic oak samples, but also from total RNA extracted from asymptomatic *Sambucus nigra*, *Chenopodium quinoa* and from RNA and DNA of *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun'. Phylogenetic analysis revealed further similarities to RdRp's of endogenous dsRNA of *Pyrus* and chloroplasts of *Bryopsis*, both members of the *Partitiviridae* as well as BCV 3. These results strongly indicate that the 1.6/1.5 kb dsRNA of oak is endogenous dsRNA and not likely to be causal for the ringspot symptoms of oaks.

Another dsRNA fragment of 3,5 kb was found in a sample of bark-tissue of diseased trees in Berlin-Grunewald. Leaves with chlorotic ringspots and distinct local lesions, collected in Hopels (Lower Saxony) show further fragments of 5,0 and 1,7 kb. Possibly the high-molecular fragments are a sign of infection of oaks with another class of viruses, which cause the chlorotic ringspots in oaks.

Schlagwörter:

Stieleiche, chlorotische Ringflecken, Serologie, Partikeln, Elektronenmikroskopie, Tobamoviren, kryptische Viren, dsRNA, c-DNA-Synthese, DOP-PCR, Sequenzanalysen

Keywords:

common oak, chlorotic ringspots, serology, electron microscopy, tobamoviruses, cryptic viruses, dsRNA, cDNA synthesis, DOP-PCR, sequence analyses

Literatur

- Abouzid, A. M., Jeske, H. (1986): The purification and characterization of gemini particles from Abutilon mosaic virus infected Malvaceae. *J. Phytopathol.* **115**, 344-353
- Accotto, G. P., Boccardo, G. (1986): The coat proteins and nucleic acids of two cryptic viruses. *J. Gen. Virol.* **67**, 363-366
- Accotto, G. P., Brisco, M. J., Hull, R. (1987): In vitro translation of the double-stranded RNA genome from Beet cryptic virus 1. *J. Gen. Virol.* **68**, 1417-1422
- Accotto, G. P., Marzachi, C., Luisoni, E., Milne, R. G. (1990): Molecular characterisation of Alfalfa cryptic virus 1. *J. Gen. Virol.* **71**, 433-437
- Ackermann, K. (1991): Kirschenblattrollvirus: Sequenz- und Strukturuntersuchungen der 3'-nichtkodierenden Region und Nachweis des Virus in Waldbäumen. Dissertation, Universität Düsseldorf, 109 S.
- Adkins, S., Roskopf, E. N. (2002): Key west nightshade, a new experimental host for plant viruses. *Plant Dis.* **86/12**, 1310-1314
- Ahn, I. P., Lee, Y. H. (2001): A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **14/4**, 496-507
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffler, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402
- Antoniw, J. F., Linthorst, H. J. M., White, R. F., Bol, J. F. (1986): Molecular cloning of double-stranded RNA of Beet cryptic viruses. *J. Gen. Virol.* **67**, 2047-2051
- Argos, P. (1988): A sequence motif in many polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9909-9916
- Arancibia, R. A., Valverde, R. A., Can, F. (1995): Properties of a cryptic virus from pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Pathol.* **44**, 164-168
- Balter, M. (1998): Research News: Virology: Viruses have many ways to be unwelcome guests. *Science* **280/5361**, 204-205
- Bamford, D. H., Burnett, R. M., Stuart, D. I. (2002): Evolution of viral structure. *Theoret. Pop. Biol.* **61**, 461-470
- Bastos, A. D. S., Haydon, D. T., Forsberg, R., Knowles, N. J., Anderson, E. C., Bengis, R. G., Nel, L. H., Thomson, G. R. (2001): Genetic heterogeneity of SAT-1 type Foot-and-mouth disease viruses in southern Africa. *Arch. Virol.* **146**, 1537-1551
- Barnett, O. W. (1971): Mosaic of black jack oak. *Pl. Dis. Rep.* **55**, 411
- Batten, J. S., Scholthof, K.-B. G., Miller, M. E., Martyn, R. D. (2000): cDNA Probes detection of specific dsRNA from the fungal pathogen *Monosporascus cannonballus*. *J. Virol. Meth.* **84**, 209-215
- Bedgood, D. R., Jr., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., Robards, K. (2005): Analytical approaches to the determination of simple biophenols in forest trees such as *Acer* (maple), *Betula* (birch),

- Coniferus, Eucalyptus, Juniperus (cedar), Picea (spruce) and Quercus (oak). The Analyst 130/6, 809 - 823
- Benthack, W. (2001): Klonierung und partielle Charakterisierung des unbekannten Erregers der Ringfleckigkeit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) anhand doppelsträngiger RNA. Dissertation, Universität Hamburg, 152 S.
- Benthack, W., Mielke, N., Büttner, C., Mühlbach, H.-P. (2005): Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with the ringspot disease in European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). Arch. Virol. 150, 37-52
- Ber, R., Navot, N., Zamir, D., Antignus, Y., Cohen, S., Czosnek, H. (1990): Infection of tomato by the Tomato yellow leaf curl virus: susceptibility to infection, symptom development, and accumulation of viral DNA. Arch. Virol. 112/3-4, 169-180
- Bertaccini, A., Vibio, M., Bellardi, M. G. (1996): Virus diseases of ornamental shrubs. X. Euphorbia pulcherima Willd. Infected by viruses and phytoplasmas. Phytopath. Medit. 35/3, 129-132
- Berzal-Herranz, A., de la Cruz, A., Tenllado, F., Diaz-Ruiz, J. R., Lopez, L., Sanz, A. I., Vaquero, C., Serra, M. T., Garzia-Luque, I. (1995): The capsicum L3 gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. Virol. 20, 498-505
- Bitterlin, M. W., Gonsalves, D. Cummins, J. N. (1984): Irregular distribution of Tomato ringspot virus in apple trees. Plant Dis. 68, 567-571
- Blattny, C., Prochazkova, Z. (1966): Beitrag zur Kenntnis der Virosen und virusverdächtigen Erkrankungen der Eichen (*Quercus* spp.) Rev. Roumaine Biol. Ser. Bot. 11, 39-42
- Blawid, R. Mais, E. E. (2004): Cloning and molecular characterization of a RNA-dependent RNA polymerase of Vicia cryptic virus. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft. 396, 548
- Blum, H. Beier, H. and Gross, H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8, 93-99
- BMVEL (2003): Nationales Waldbauprogramm Deutschland. Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, 16 S. <<http://www.nwp-online.de/>> Zugriff: 22.06.2005
- BMVEL (2004): Waldzustandsbericht der Bundesregierung. Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, 90 S.
- Boccardo, G., Milne, R. G., Louisoni, E., Lisa, V., Accotto, G. P. (1985): 3 seedborne cryptic viruses containing double-stranded RNA isolated from white clover. Virol. 147/1, 29-40
- Boccardo, G., Lisa, V., Luisoni, E., Milne, R. G. (1987): Cryptic plant viruses. Adv. Virus Res. 32, 171-214
- Boccardo, G., Accotto, G. P. (1988): RNA-dependent RNA polymerase activity in two morphologically different White clover cryptic viruses. Virol. 163/2, 413-419

- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E., van der Nordaa, J. (1990): Rapid and simply method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495-503
- Borja, M., Sanchez, F., Rowhani, A., Bruening, G, Ponz, F. (1996): Long, nearly identical untranslated sequences at the 3' terminal regions of the genomic RNAs of Cherry leaf roll virus (walnut strain). *Virus Genes* 10/3, 245-252
- Bouani, A., Al Rwahnih, M., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Alami, I., Zemzami, M., Myrta, A. V. Savino, V. (2004): A preliminary account of the sanitary status of stone-fruit trees in Morocco. *EPPO Bulletin* 34/3, 399
- Bruenn, J. A. (1993): A closely related group of RNA dependent RNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* 21, 5667-5669
- Bruenn, J. A. (2003): A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* 31/7, 1821-1829
- Brunner, A. M., Yakovlev, I.A., Strauss, S. H. (2004): Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol.* 4/14 *Online*, <[http:// www.biomedcentral.com/1471-2229/4/14](http://www.biomedcentral.com/1471-2229/4/14)> Zugriff: 08.05.05.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J., Watson, L., Zurcher, E. J. (1996): Plant viruses online: Descriptions and lists from the VIDE database. Version: 20th August 1996., URL <<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vid/>> Zugriff: 08. 05.05.
- Büchen-Osmond, C. (2003): The universal virus database ICTVdB. *Computing in Science and Engineering* 5/3, 16-25
- Büttner, C., Nienhaus, F. (1989a): Viruscontamination of waters in two districts of the Rhineland area (FRG). *Eur. J. For. Pathol.* 19, 206-211
- Büttner, C., Nienhaus, F. (1989b): Virus contamination of soils in forest ecosystems of the Federal Republic of Germany. *Eur. J. For. Pathol.* 19, 47-53
- Büttner, C. (1993): Viruserkrankungen an Laubgehölzen. *Deutsche Baumschule* 11, 552-554
- Büttner, C., Führling, M. (1993): Beobachtungen zu virusbedingten Symptomen an erkrankten Stieleichen (*Quercus robur* L.) – eine Abgrenzung zu ähnlichen, nicht virusbedingten Krankheitsbildern. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 45, 110-115
- Büttner, C., Führling, M., Quad, A. (1993): Virus infection as a predisposing factor in diseased oak trees. Recent advances in studies on oak decline (eds. N. Luisi, P. Lerario, A. Vannini), *Tipolitografia Radio, Putignano (Bari)*, 463-469
- Büttner, C., Führling, M. (1996): Studies on virusinfections of diseased *Quercus robur* (L.) from forest stands in Northern Germany. *Ann. Sci. For.* 53, 383-388
- Büttner, C., Führling, M., Werner, R., Mühlbach, H.-P., Lukács, N. (1996): Phytopathogene Viren in Laubbäumen des öffentlichen Grüns und Baumschulen sowie in Böden und Gewässern- eine diagnostische Vorgehensweise. *Gesunde Pflanze* 48, 95-103

- Büttner, C., Führling, M. (1998): Studien zum Auftreten der Ringfleckigkeit und Scheckung der Blätter von Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.). *Forstw. Cbl.* 117, 327-338
- Butin, H. (1985): Waldsterben: Immissions- oder Infektionshypothese? *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* 37, 5-7
- Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H., Stuart, D. I. (2001): A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 410, 235-240
- Cashdollar, L. W., Esparza, J., Hudson, G. R., Chmelo, R. Lee, P. W. K., Joklik, W. K. (1982): Cloning the double-stranded RNA genes of Reovirus: Sequence of the cloned S2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7644-7648
- Cambra, M., Olmos, A., Gorris, M. T. (2004): Diagnostic protocols for regulated Citrus tristeza closterovirus pests. *EPPO Bulletin* 34/2, 239
- Che, X., Mawassi, M., Bar-Joseph, M. (2002): A novel class of large and infectious defective RNAs of Citrus tristeza virus. *Virology* 298/1, 133-145
- Choi, Y. G., Randles, J. W. (1997): Microgranular cellulose improves dsRNA recovery from plant nucleic acid extracts. *BioTechniques* 23, 610-611
- Cilas, C., Muller, E., Mississo, E. (2005): Occurrence of Cacao swollen shoot virus in Litimé, the main cocoa-producing area of Togo. *Plant Dis.* 89, 913
- Clark, M. F., Adams, A. N. (1977): Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J. Gen. Virol.* 34, 51-857
- Coffin, R. S., Coutts, R. H. A. (1992): DsRNA cloning and diagnosis of Beet pseudo-yellows virus by PCR and nucleic acid hybridisation. *Intervirology* 33, 197-203
- Cook, G., Kotzé, J. M., Nel, L. H. (1994): Double-stranded RNA comprising the putative Avocado virus 1 has a high degree of sequence homology to the avocado genome. *Plant Pathol.* 43, 913-916
- Cooke, J. E. K., Weih, M. (2005): Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. *New Phytologist* 167, 19-30
- Cooper, J. I., Atkinson, M. A. (1975): Cherry leaf roll virus, a cause of chlorotic symptoms in *Betula* spp. In the United Kingdom. *Forestry* 48, 193-203
- Cooper, J. I. (1979): Virus diseases of trees and shrubs. Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge, 74 S.
- Cooper, J. I., Edwards, M. L. (1980): Cherry leaf roll virus in *Juglans regia* in the United Kingdom. *Forestry* 53, 41-50
- Cox, S., Mayo, M. A., Jones, A. T. (2000): The occurrence of dsRNA species in apparently healthy and virus-infected ribes cultivars, and evidence that such species originated from a member of virus family. *Totiviridae. Eur. J. Plant Pathol.* 106/4, 353-364
- de la Cruz, A., Lopez, L., Tenllado, F., Diaz-Ruiz, J. R., Lopez, L., Sanz, A. I., Vaquero, C., Serra, M. T., Garzia-Luque, I. (1997): The coat protein is required for the elicitation of the capsicum L2

- genome-mediated resistance against the tobamoviruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 107-113
- Dallwitz, M. J. (1980): A general system for coding taxonomic descriptions. *Taxon* **29**, 41-46
- Dallwitz, M. J., Paine, T. A., Zurcher, E. J. (1993): User's guide to the DELTA system: a general system for processing taxonomic descriptions. 4th edition. (CSIRO Division of Entomology: Canberra), 136 S.
- Danielsson, B., Ekman, R., Johansson, B. G. (1978): Plasma lipoprotein separations by zonal ultracentrifugation. *Prep Biochem.* **8/4**, 295-319
- Daubert, S. (1988): Sequence determinants of symptoms in the genomes of plant viruses, viroids, and satellites. *Mol. Plant Microb. Interact.* **1**, 317-325
- Decroocq, V., Schurdi-Levraud, V., Eyquard, J. P., Legall, O., Wawrzyńczak, D., Del Amo, J., Simon, L., Martínez, A. (2004): Prunus/PPV interactions: a molecular approach. *Acta Hort. (ISHS)* **657**, 331-334
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., Argos, P. (1990): An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng.* **3**, 461-467
- Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B. (1983): A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**, 19-21
- DePaulo, J. J., Powell, C. A. (1995): Extraction of double-stranded RNA from plant tissues without the use of organic solvents. *Plant Dis.* **79**, 246-248
- Desbiez, C., Gal-On, A., Girard, M., Wipf-Scheibel, C., Lecoq, H. (2003): Increase in Zucchini yellow mosaic virus symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Phytopathol.* **93/12**, 1478-1484
- Devic, M., Jaegle, M., Baulcombe, D. (1990): Cucumber mosaic virus satellite RNA (strain Y): Analysis of sequences which affect systemic necrosis on tomato. *J. Gen. Virol.* **71**, 1443-1449
- Dijkstra, J., Keesen, E., Brink, M., Peters, D., Lohus, H. (1996): Identification and characterisation of a potyvirus in Bambara groundnut. *Afric. Crop Sci. J.* **4/1**, 97-104
- Dodds, J. A., Bar-Joseph, M. (1983): Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. *Phytopathol.* **73**, 419-423
- Dodds, J. A., Morris, T. J., Jordan, J. L. (1984): Plant viral double-stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.* **22**, 151-168
- Dodds, J. A. (1993): DsRNA in diagnosis. In: *Diagnosis of plant virus diseases*. R. E. F. Matthews (ed). CRC Press, Boca Raton, FL, 273-294
- Domingo, E., Holland, J. J. (1994): Mutations rates and rapid evolution of RNA viruses. In: *The Evolutionary Biology of Viruses* (Morse, S. S., ed.). The Evolutionary Biology of Viruses, Raven, NY, 161-184

- Dougherty, W. G., Parks, T. D. (1995): Transgenes and gene suppression: Telling us something new? *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 399-405
- Dunn, D. B., Hitchborn, J. H. (1965): The Use of bentonite in the purification of plant viruses. *Viol.* 25, 171-192
- Eckstein, D., Dujesiefken, D. (1993): Zum Eichensterben in Berlin. *AFZ* 48, 666
- Elleuch, A., Fakhfakh, H., Jendoubi, L., Bessaies, N., Marrakchi, M. (2003): Comparative analysis of techniques for detection of grapevine and citrus viroids in Tunisia. *EPPO Bulletin* 33/2, 369-374
- Erlbeck, R., Haseder, I. E., Stinglwagner, G. K. F. (2002): *Das Kosmos Wald- und Forstlexikon*. Franckh-Kosmos-Verlags-GmbH, Stuttgart, 2. Aufl., 880 S.
- Fairbanks, D. J., Smith, S. E., Brown, J. K. (1988): Inheritance of large mitochondrial RNAs in alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 76, 619-622
- Fillhart, R. C., Bachand, G. D., Castello, J. D. (1998): Detection of infectious tobamoviruses in forest soils. *Appl. Envir. Microbiol.* 64, 1430-1435
- Fraenkel-Conrat, A. (1983): RNA depending RNA polymerases of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 422-424
- Franklin, R. M. (1996): Purification and properties of replicative intermediates of the RNA bacteriophage R 17. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55, 1504-1511
- Freshwater, D. W., Fredericq, S., Bailey, J. C. (1999): Characteristics and utility of nuclear-encoded large-subunit ribosomal gene sequences in phylogenetic studies of red algae. *Phycological Res.* 47/1, 33
- Frison, E. A., Taher, M. M. (eds.) (1991): *FAO/IBPGR: Technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/ International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 50 S.
- Fritsche, R., Kegler, H. (1966): Die Übertragung des Blattrollvirus der Kirsche (Cherry leaf roll virus) durch Nematoden. *Die Naturwissenschaften* 51, 299
- Ford, R. E., Moline, H. E., McDaniel, G. L., Mayhew, D. E., Epstein, A. H. (1972): Discovery and characterisation of Elm mosaic virus in Iowa. *Phytopathol.* 62, 987-992
- Fuchs, E., Merker, D. (1985): Partielle Reinigung des Chlorotischen Blattfleckungs-Virus des Apfels (Apple chlorotic leaf spot virus) und Antiserumherstellung. *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz* 21, 101-110
- Fuchs, E., Grüntzig, M. (1994): Verteilungsmuster von Viren in holzigen Wirtspflanzen. *Kühn-Archiv* 88, 40-53
- Führling, M. (1994): *Virologische Studien an erkrankten Stieleichen (Quercus robur L.) und Ebereschen (Sorbus aucuparia L.) in Norddeutschland sowie Untersuchungen von stoffwechselphysiologischen Veränderungen durch abiotische Stressoren an ausgewählten virusinfizierten Forstgehölzen*. Dissertation, Universität Hamburg, 142 S.

- Führling, M., Büttner, C. (1995): Studien zu virusinduzierten Symptomen an Stieleiche (*Quercus robur* L.). BDGL-Schriftenreihe 13, 99
- Führling, M., Büttner, C. (1998): Studien zum Auftreten der Ringfleckigkeit und Scheckung der Blätter von Ebereschen (*Sorbus aucuparia* L.). Forstw. Cbl. 117, 372-338
- Führer, E. (1987): Eiche- Erkrankungen in Mitteleuropa. Österr. Forstzeitung 98/2, 33-34
- Fukuhara, T., Moriyama, H., Pak, J.-Y., Hyakutake, H., Nitta, T. (1993): Enigmatic double-stranded RNA in Japonica rice. Plant Mol. Biol. 21, 1121-1130
- Fukuhara, T., Moriyama, H., Nitta, T. (1995): The unusual structure of novel RNA replicon in rice. J. Biol. Chem. 270, 18147-18149
- Fukuhara, T. (1999): Double-stranded RNA in rice. J. Plant Res. 112, 131-138
- Fulton, R. W. (1966): Mechanical transmission of viruses of woody plants. Ann. Rev. Phytopathol. 4, 79-102
- Gabriel, C. J., Walsh, R., Nolt, B. L. (1987): Evidence for a latent virus-like agent in cassava. Phytopathol. 77, 92-95
- Gal-On, A., Kaplan, I., Palukaitis, P. (1995): Differential effects of satellite RNA on the accumulation of Cucumber mosaic virus RNAs and their encoded proteins in tobacco vs. zucchini squash with two strains of CMV helper virus. Virol. 208, 58-66
- Gal-On, A., Meiri, E., Elman, C., Gray, D. J., Gaba, V. (1997): Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral encoding constructs by particle bombardment. J. Virol. Meth. 64/1, 103-110
- Garnsey, S. M., Gonsalves, D., Purcifull, D. E. (1977): Mechanical transmission of Citrus tristeza virus. Phytopathol. 67, 965-968
- Garret, R. G., Cooper, J. A., Smith, P. R. (1985): Virus epidemiology and control. In: The plant viruses, Vol. 1: Polyhedral virions with tripartite genomes (ed. R. I. B. Francki) Plenum Press, NY, 269-297
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R. D., Bairoch A. (2005): Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. 571-607
- German, S., Candresse, T., Le Gall, O., Lanneau, M., Dunez, J. (1992): Analysis of the dsRNAs of Apple chlorotic leaf spot virus. J. Gen. Virol. 73, 767-773
- Getachew, G. (1999): Tannins in tropical multipurpose tree species: Location and quantification of tannins using histochemical approaches and the effect of tannins on in vitro rumen fermentation. Diss. Univ. Hohenheim, 186 S.
- Ghabrial, S. A., Bozarth, R. F., Buck, K. W., Yamashita, S., Martelli, G. P., Milne, R. G. (1994): Partitiviridae. In: Murphy, F. A. (Ed.) Sixth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, NY, 253-260

- Ghabrial, S. A. (1998): Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes* 16/1, 119-131
- Gibbs, M. J., Koga, R., Moriyama, H., Pfeiffer, P., Fukuhara, T. (2000): Phylogenetic analysis of some large double-stranded RNA replicons from plants suggests they evolved from a defective single-stranded RNA virus. *J. Gen. Virol.* 81, 227-233
- Gooding, G. V., Hebert, T. T. (1967): A simple technique for purification of Tobacco mosaic virus in Large Quantities. *Phytopathological Notes* 57/11, 1285
- Goodin, M. M. (1995): Characterisation of two viruses associated with *Agaricus bisporus*. Dissertation, Pennsylvania State University, 167 S.
- Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddam, J.-L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalkmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H. J., Ward, V. K. (2002): The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J. Mol. Biol.* 324, 47-62
- Gorziglia, M., Cashdollar, L. W., Hudson, G. R., Esperienza, J. (1983): Molecular cloning of a human rotavirus genome. *J. Gen. Virol.* 64, 2585-2595
- Gopalakrishna, R. (1999): Possible functions of a RNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic cells. *Curr. Sci.* 77/8, 1029-1032
- Grill, L. K., Garger, S. J. (1988): Identification and characterisation of double-stranded RNA associated with cytoplasmic male sterility in *Vicia faba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7043-7046
- Grüntzig, M., Fuchs, E., Pfeilstetter, E., Al Kai, B., Otto, F. (1994): Untersuchungen zur Verteilung mechanisch übertragbarer Viren in Bäumen des Kern- und Steinobstes. *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz.* 29, 217-248
- Hager, H. (1993): Neuere Forschungsergebnisse zum Eichensterben. *Österr. Forstzeitung* 104, 56-57
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 136, 557-580
- Harper, G., Richert-Poggeler, K. R., Hohn, T., Hull, R. (2003): Detection of *Petunia* vein-clearing virus: model for detection of DNA viruses in plants with homologous endogenous pararetrovirus sequences. *J. Virol. Meth.* 107/2, 177-184
- Hartmann, G., Blank, R., Lewark, S. (1989): Eichensterben in Norddeutschland. *Forst und Holz* 44, 475-487
- Hassan, M., Rysanek, P., Di Serio, F. (2004): Mixed infection of peach trees with Peach latent mosaic viroid and Hop stunt viroid in Czech Republic. *Acta Hort. (ISHS)* 657, 397-400
- Hengen, P. N. (1995): Quantitative PCR: an accurate measure of mRNA? *TIBS* 20, 476-477
- Hentsch, T. I. (1998): Untersuchungen zum Auftreten und zur Diagnose von Viren in Forstbaumschulen. Dissertation, Martin- Luther- Universität, Halle- Wittenberg, 146 S.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

- weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22, 4673-4680
- Hiruki, C., Teakle, D. S. (1987): Soil-borne viruses of plants. *Curr. Top. Vector Res.* 3, 177-215
- Hillmann, B. L., Fulbright, D. W., Nuss, D. L., van Alfen, N. K. (1994): Hypoviridae. In: F. A. Murphy (Ed.) *Sixth Report of International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag, NY, 261-264
- Horiuchi, H., Udagawa, T., Koga, R., Moriyama, H., Fukuhara, T. (2001): RNA-dependent RNA polymerase activity associated with endogenous double-stranded RNA in rice. *Plant and Cell Physiol.* 42/2, 197-203
- Horiuchi, H., Fukuhara, T. (2004): Putative replication intermediates in endornavirus, a novel genus of plant dsRNA viruses. *Virus Genes* 29/3, 365-375
- Horváth, J., Ecke I., Gál, T., Dezséry, M. (1975): Demonstration of virus-like particles in sweet chestnut and oak with leaf deformation in Hungary. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 82, 489-502
- Ishihara, J., Pak, J. Y, Fukuhara, T., Nitta, T. (1992): Association of particles that contain double-stranded RNAs with algal chloroplasts and mitochondria. *Planta* 187, 475-482
- Iwanami, T., Shimizu, T. (2004): Tolerance to Citrus mosaic virus in transgenic trifoliate orange lines harboring capsid polyprotein gene. *Plant Dis.* 88, 865-868
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., Aravind, L. (2003): Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Struct. Biol.* 3/1, 1-23
- Jacobi, V., Castello, J. D. (1991): Isolation of Tomato mosaic virus from water draining forest stands in New York State. *Phytopathol.* 81, 1112-1117
- Jacobi, V., Bachand, G. D., Hamelin, R. C., Castello, J. D. (1998): Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of Tomato and Tobacco mosaic tobamoviruses. *J. Virol. Meth.* 74, 167-178
- Jaakola, L., Pirttilä, A. M., Hohotola, A. (2001): CDNA blotting offers an alternative method for gene expression studies. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19, 125-128
- Jeffries, C. , James, C. (2005): Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin* 35/1, 125
- Jelkmann, W., Martin, R. R., Maiss, E. (1989): Cloning of four plant viruses from small quantities of double-stranded RNA. *Phytopathol.* 79/11, 1250-1253
- Jelkmann, W., Kunze L., Vetten, H.-J., Lesemann, D. E. (1992): CDNA cloning of dsRNA associated with Apple stem pitting disease and evidence for the relationship of the viruslike agents associated with Apple stem pitting and Pear vein yellows. *Acta Hort. (ISHS)* 309, 55-62
- Jelkmann, W. (1995): Cherry Virus A: cDNA cloning of dsRNA nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *J. Gen. Virol.* 76, 2015-2024

- Jones, A. T., Murant, A. F. (1971): Serological relationship between Cherry leaf roll virus, Elm mosaic virus and Golden elderberry viruses. *Ann. Appl. Biol.* 69, 11-15
- Jones, A. T., Wood, G. A. (1978): The occurrence of Cherry leaf roll virus in red raspberry in New Zealand. *Pl. Dis. Rep.* 62, 835-838
- Jones, A. T., McElroy, F. D., Brown, D. J. D. (1981): Test for transmission of Cherry leaf roll virus using *Longidorus*, *Paralongidorus* and *Xiphinema* nematodes. *Ann. App. Biol.* 99, 143-150
- Jones, A. T., Roberts, I. M., McGavin, W. (2004): Unusual filamentous virus-like particles in symptomless blackberry associated with severe leaf curling in the virus indicator *Rubus macraei*, and anomalous data using a degenerate badnavirus primer in PCR of *Rubus* species. *Ann. Appl. Biol.* 144/1, 87-94
- Jordan, R. L., Dodds, J. A., Ohr, H. D. (1983): Evidence for viruslike agents in avocado. *Phytopathol.* 73, 1130-1135
- Kamenova, I., Adkins, S. (2004): Comparison of detection methods for a novel tobamovirus isolated from Florida hibiscus. *Plant Dis.* 88, 34-40
- Kamer, G., Argos, P. (1984): Primary structural comparison of RNA-dependent RNA polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucl. Acids Res.* 12, 7269-7282
- Karan, M., Hicks, S., Harding, R. M., Teakle, D. S. (1991): Stability and extractability of double-stranded RNA of Pangola stunt and Sugarcane Fiji disease viruses in dried plant tissue. *J. Virol. Meth.* 33, 211-216
- Kassanis, B., White, R. F., Woods, R. D. (1977): Beet cryptic virus. *Phytopathol. Z.* 90, 350-360
- Kassanis, B., Russel, G. E., White, R. F. (1978): Seed and pollen transmission of Beet cryptic virus in sugar beet plants. *Phytopathol. Z.* 91, 76-79
- Kegler, H. (1960): Das Ringfleckenmosaik der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.). *Phytopath. Z.* 62, 214-216
- Kegler, H., Fuchs, E., Spaar, D., Kegler, J. (1995): Viren im Boden und im Grundwasser (Übersichtsbeitrag). *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz* 29, 349-371
- Keim-Konrad, R., Jelkmann, W. (1996): Genome analysis of the 3'-terminal part of Little cherry disease associated dsRNA reveals a monopartite clostero-like virus. *Arch. Virol.* 141, 1-14
- Kellmann, J.-W., Liebisch, P., Schmitz, K.-P., Piechulla, B. (2001): Visual representation by atomic force microscopy (AFM) of Tomato spotted wilt virus ribonucleoproteins. *Biol. Chem.* 382, 1559-1562
- Kim, K. S., Fulton, J. F. (1973): Association of viruslike particles with a ringspot disease of oak. *Plant Dis. Rept.* 57/12, 1029-1031
- Kirstensen, H. R. (1963): Oak mosaic. *Tidsskr. PlAvl.* 67, 616
- König, B., Roffael, E. (2003): Zur Extraktion von Fichtenrinde mit Harnstoff und Harnstoff-Formaldehyd-Polymeren. *Holz als Roh- und Werkstoff* 61/3, 206-212

- Koga, R., Fukuhara, T., Nitta, T. (1998): Molecular characterization of a single mitochondria-associated double-stranded RNA in green alga, *Bryopsis*. *Plant Mol. Biol.* 36, 717-724
- Koga, R., Horiuchi H., Fukuhara, T. (2003): Double-stranded RNA replicons associated with chloroplasts of a green alga, *Bryopsis cinicola*. *Plant Mol. Biol.* 51, 991-999
- Kontzog, H. G., Kleinhempel, H., Matschke, J. (1990): Combined effects of environmental stress and virus infections on the growth of forest trees. *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz* 26, 359-362
- Kowalski, T. (1991): Oak decline: I. Fungi associated with various disease symptoms on overground portions of middle aged and old oak. (*Quercus robur* L.). *Eur. J. For. Path.* 21, 136-151
- Kühne, T., Stanarius, A., Kleinhempel, H. (1986): Cryptic viruses – a new term in plant virology? *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz* 22/3, 179-187
- Kühne, T., Stanarius, A., Schubert, J. (1987): Latent virus showing properties of cryptic viruses detected in *Sinapis alba* L. *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz* 23/6, 499-500
- Kühne, T., Stanarius, A. (1990): Tissue-specific localisation of Beet cryptic virus 1 and Beet cryptic virus 2 in *Beta vulgaris* L. *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz* 26/5, 487-489
- Landeshauptstadt Dresden, Amt für Umweltschutz (1995): Umweltatlas Dresden, Hauptbodengesellschaften- Schematische Übersichtskarte
- Leiser, R. M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, H., Richards K., Jonard, G. (1992): Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with Beet western yellows luteovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89/19, 9136-9140
- Lentovyc, R., Capek, M. (1987): Eichenwelken in der Slowakei. *Österr. Forstzeitung* 98/3, 51-52
- Lefebvre, A., Scalla, R., Pfeiffer, P. (1990): The double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic membranous vesicles. *Plant Mol. Biol.* 14, 477-490
- Letschert, B., Adam, G., Lesemann, D. E., Willingmann, P., Heinze, C. (2002): Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *J. Virol. Meth.* 106, 1-10
- Letschert, B. (2003): Tobamoviren: Differenzierung aufgrund ihrer genetischen Heterogenität und die diagnostische Relevanz. Dissertation Universität Hamburg, 119 S.
- Levi, A., Galau, G. A., Wetzstein, H. Y. (1992): A rapid procedure for the isolation of RNA from high-phenolic-containing tissues of pecan. *Hort Sci.* 27, 1316-1318
- Libonati, M., Carsana, A., Furia, A. (1980): Double-stranded RNA. *Mol. Cell. Biochem.* 31, 147-164
- Lister, R. M., Hadidi, A. F. (1971): Some properties of Apple chlorotic leaf spot virus and their relation to purification problems. *Virol.* 45, 240-251
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallóczy, Z., Levine, B., Dinesh-Kumar, S. P. (2005): Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121/4, 567-577
- Löffert, D., Schaffrath, N., Berkenkopf, M., Stump, S. (1997): PCR optimization. *Quiagen News* 2, 2-21

- Loreti, S., Faggioli, F., Barrale, R., Barba, M. (1998): Occurrence of viroids in temperate fruit trees in Italy. *Acta Hort. (ISHS)* 472, 555-559
- Lovisolo, O., Accotto, G. P., Masenga, V., Colariccio, A. (2003): An isolate of Apple Stem grooving virus associated with cleopatra mandarin fruit intumescence. *Fitopatol. Bras.* 28/1, 54-58
- Lonsdale, D. H. (1986): Viral RNA in mitochondria? *Nature* 323, 299
- Louisoni, E., Milne, R. G., Accotto, P., Boccardo, G. (1987): Cryptic viruses in hop trefoil (*Medicago lupulina*) and their relationship to other cryptic viruses in legumes. *Intervirol.* 28, 144-156
- Lukács, N. (1994): Detection of virus infection in plants and differentiation between coexisting viruses by monoclonal antibodies to double-stranded RNA. *J. Virol. Meth.* 47, 255-272
- Maiss, E., Breyel, E., Casper, R., Lesemann, D. E. (1987): Detection of Plumbox virus by isolation of double-stranded ribonucleic acid (dsRNA). *EPPO Bulletin* 17, 91-95
- Makkar, H. (2005): Use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on tanniniferous tree foliage: Achievements, result implications, and future research. *Animal Feed Sci.* 122/1-2, 3-12
- Makkar, H., Blummel, M., Becker, K. (1995): Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylen glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in vitro techniques. *Br. J. Nutr.* 73/6, 897-913
- Malfitano, M., Barone, M., Alioto, D. (2005): A survey of citrus viroids in Campania (Southern Italy). *Plant Dis.* 89, 434
- Maliyakal, E. J. (1992): An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucl. Acids Res.* 20, 2381
- Martelli G. P., Sabanadzovic S., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Saldarelli P. (2002): Maculavirus, a new genus of plant viruses. *Arch. Virol.* 147/9, 1847-1853
- Masuta, C., Komari, T., Takanami, Y. (1989): Expression of Cucumber mosaic virus satellite RNA from cDNA copies in transgenic tobacco plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 55, 49-55
- Matthews, R. E. F. (1991): *Plant virology*. 3rd Edition. Academic Press, 830 S.
- Marcu, G. (1987): Ursachen des Eichensterbens in Rumänien und Gegenmaßnahmen. *Österr. Forstzeitung* 98/3, 53-54
- Meng, B., Pan, S., Forsline, P. L., Mc Ferson J. R., Gonsalves, D. (1998): Nucleotide sequence and genome structure of Grapevine rupestris stem pitting associated virus 1 reveal similarities to Apple stem pitting virus. *J. Gen. Virol.* 79, 2059-2069
- Menzel, W., Jelkmann, W., Maiss, E. (2002): Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of mRNA as internal control. *J. Virol. Meth.* 9, 81-92
- Mertens, P. (2004): The dsRNA viruses. *Virus Res.* 101/1, 3-13

- Mielke, N. (2004): Molekulare Charakterisierung eines mit der Ringfleckigkeit der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) assoziierten neuen Pflanzenvirus. Dissertation, Universität Hamburg, 2004, 122 S.
- Mijatovic, M., Ivanovic, M., Obradovic, A., Zecevic, B. (2002): Potato Virus Y (PVY) on pepper in Serbia. *Acta Hort. (ISHS)* 579, 545-549
- Mikkelsen, S. R., Cortón, E. (2004): Centrifugation methods. *Bioanalytical Chemistry*, 384 S.
- Mink, G. I. (1993): Pollen- and seed-transmitted viruses and viroids. *Ann. Rev. Plant Pathol.* 31, 375-402.
- Mittler, R., Simon, L., Lam, E. (1997): Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. Cell Sci.* 110/11, 1333-1344
- Miyazaki, S., Iwabuchi, K., Pak, J. Y., Fukuhara, T., Nitta, T. (1996): Selective occurrence of endogenous double-stranded RNAs in insects. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 26, 955-961
- Morris, T. J., Dodds, J. A. (1979): Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plants and fungal tissue. *Phytopathol.* 69, 854-858
- Moriyama, H., Nitta, T., Fukuhara, T. (1995): Double-stranded RNA in rice: a novel RNA replicon in plants. *Mol. Gen. Genet.* 248, 364-369
- Moriyama, H., Kanaya, K., Wang, J. Z., Nitta, T., Fukuhara, T. (1996): Stringently and developmentally regulated levels of cytoplasmatic double-stranded RNA and its high-efficiency transmission via egg an pollen in rice. *Plant Mol. Biol.* 31, 713-719
- Moriyama, H., Horiuchi, H., Koga, R., Fukuhara, T. (1999a): Molecular characterisation of two endogenous double-stranded RNAs in rice and their inheritance by interspecific hybrids. *J. Biol. Chem.* 274, 6883-6888
- Moriyama, H., Horiuchi, H., Nitta, T., Fukuhara, T. (1999b): Unusual inheritance of evolutionarily-related double-stranded RNAs in interspecific hybrid between rice plants *Oryza sativa* and *Oryza rufipogon*. *Plant Mol. Biol.* 39, 1127-1136
- Muller, R., Poch, O., Delarue, M., Bishop, D. H., Bouloy, M. (1994): Rift valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J. Gen. Virol.* 75, 1345-1352
- Muller, E., Sackey, S. (2005): Molecular variability analysis of five new complete Cacao swollen shoot virus genomic sequences. *Arch. Virol.* 150, 53-66
- Natsuaki, T., Okuda, S., Teranaka, M., Yamashita, S., Doi, Y. (1983): Radish yellow edge virus, a seed-borne virus with double-stranded RNA of a possible new group. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49, 593-599
- Natsuaki, T., Natsuaki, K. T., Okuda, S., Teranaka, M., Milne, R. G., Boccardo, G., Louisoni, E. (1986): Relationship between the cryptic and temperate viruses of alfalfa, beet and white clover. *Interviol.* 25, 69-75

- Newbury, H. J., Possingham, J. V. (1977): Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissue containing interfering phenolic compounds. *Plant Physiol.* 60, 543-547
- Nienhaus, F. (1971): Tobacco mosaic virus strains extracted from conidia of powdery mildew. *Virol.* 46, 504-505
- Nienhaus, F. (1972): Latent virusinfection in *Chenopodium*. *Phytopath. Z.* 73, 81-82
- Nienhaus, F., Yarwood, C. E. (1972): Transmission of virus from oak leaves fractionated with Sephadex. *Phytopathol.* 62, 313-315
- Nienhaus, F. (1975): Viren und virusverdächtige Erkrankungen an Eichen (*Quercus robur* und *Quercus sessiflora*). *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 82, 739-749
- Nienhaus, F. (1985a): Zur Frage der parasitären Verseuchung von Forstgehölzen durch Viren und primitive Mikroorganismen. *Allg. Forstz.* 6, 119-124
- Nienhaus, F. (1985b): Infectious diseases in forest trees caused by viruses, mycoplasma-like organisms and primitive bacteria. *Experientia* 41, 597-603
- Nienhaus, F., Castello, J. D. (1989): Viruses in forest trees. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27, 165-186
- Nienhaus, F., Hamacher, A. (1990): Virose in Eschen. *Allg. Forst Zeitschr.* 45, 385-386
- Nuss, D.L., Koltin, Y. (1990): Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28, 37-58
- Ohno, T., Aoyagi, M., Yamanashi, Y., Saito, H., Ikawa, S., Meshi, T., Okada, Y. (1984): Nucleotide sequence of the Tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. *J. Biochem.* 96/6, 1915-1923
- Orme, S., Kegley, S. (2004): PAN pesticide database. Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA.), <<http://www.pesticideinfo.org>> Zugriff: 29.07.05
- Osaki, H., Kudo, A., Ohtsu, Y. (1998): Nucleotide sequence of seed and pollen transmitted double-stranded RNA, which encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase detected from Japanese pear. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62/11, 2101-2106
- Osaki, H., Nomura, K., Iwanami, T., Kanematsu, S., Okabe, I., Matsumoto, N., Sasaki, A., Ohtsu, Y. (2002): Detection of double-stranded RNA virus from strain of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa* Tanaka. *Virus Genes* 25/2, 139-145
- Ouchterlony, Ö. (1968): Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers, 215 S.
- Page, R. D. M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)* 12, 357-358
- Panayotou, P. C. (1997): Water-borne plant viruses. *Hellenic Virol.* 2/1, 18-30
- Pfeiffer, P., J.-L., Heitzler, J., Keith, G. (1993): Unusual structure of the double stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility trait in *Vicia faba*. *J. Gen. Virol.* 74, 1167-1173

- Pfeiffer, P. (1998): Nucleotide sequence, genetic organization and expression strategy of the double stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility trait in *Vicia faba*. *J. Gen. Virol.* 79, 2349-2358
- Pierpoint, W. S. (2003): The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. *Protein Purification Protocols* 224, 65-74
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., Tordo, N. (1989): Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal* 8, 3867-3874
- Polák, Z., Procházková, A., Branisová, H. (1990): Recent findings of viruses of forest trees on the territory of Czech Republic. *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz* 26, 389-393
- Polivka, H., Staub, U., Gross, H. J. (1996): Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel Grapevine yellow speckle viroid 1 mutants show alterations of hairpin I. *J. Gen. Virol.* 77, 155-161
- Power, A. G., Flecker, A. S. (2005): Virus specificity in disease systems: Are species redundant? *Kap.* 17, 14 S. <www.eeb.cornell.edu/flecker/pdf/PowerFleckerVirusSpecificit.pdf> Zugriff: 17.08.05
- Promega (1996): Technical Manual: Universal RiboClone® cDNA Synthesis System. 24 S.
- Quadt, A. (1994): Untersuchungen an Laubbäumen unter Stresseinfluss durch Viren und abiotische Faktoren. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, 163 S.
- Rebenstorf, K. (2002): Untersuchungen zur serologischen und molekularen Charakterisierung verschiedener Isolate des Kirschenblatrollvirus (CLRV). Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, 101 S. <www.kathrin.rebenstorf.net/diplomarbeit/Diplomarbeit.pdf> Zugriff: 21.05.2004
- Redinbough, M. G., Louie, R., Ngwira, P., Edema, R., Gordon, D. T., Bisaro, D. M. (2001): Transmission of viral RNA and DNA to maize kernels by vascular puncture inoculation. *J. Virol. Meth.* 98/2, 135-143
- Reisner, D. (1987): Structure formation (physical-chemical properties). In: *The Viroids*. (Ed. Diner, T. O.), Plenum Press, NY (US), 63-98
- Rezaian, M., Krake, L.R., Cunying, Q., Hazzalin, C. A. (1991): Detection of virus-associated dsRNA from leafroll-infected grapevines. *J. Virol. Meth.* 31, 335-344
- Roche, Diagnostics GmbH, Roche, Molecular Biochemicals (1999): DOP PCR Master. Version 3.
- Rodríguez-Cerezo, E., Gamble-Klein, P., Shaw, J. G. (1991): A determinant of disease symptom severity is located in the 3'-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9863-9867
- Rott, M. E., Jelkmann, W. (2001): Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaption of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 411-420
- Rott, M. E., Jelkmann, W. (2005): Little cherry virus 2: Sequence and genomic organization of an unusual member of the Closteroviridae. *Arch. Virol.* 150/1, 107-23

- Rott, M., Hahn, S., Bandte, M., Büttner, C. (2004): Verfahren zur Isolierung von dsRNA aus Stieleichen (*Quercus robur* L.) mit virusverdächtigen Blattsymptomen. BDGL-Schriftenreihe 22, 123
- Routhier, E., Bruenn, J. A. (1998): Functions of conserved motifs in the RNA-dependent RNA polymerases of a yeast double-stranded RNA virus. *J. Virol.* 72/5, 4427-4429
- Ryu, K. H., Park, W. M. (1995): Rapid detection and identification of *Odontoglossum* ringspot virus by polymerase chain reaction amplification. *FEMS Microbiol. Lett.* 15, 133/3, 265-269
- Ryu, K. H., Kim, C.-H., Palukaitis, P. (1998): The coat protein of Cucumber mosaic virus is a host range determinant for infection of maize. *MPMI* 11/3, 351-357
- Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem, N., Castellano, M. A., Digiaro, M., Martelli, G. P. (2000): Grapevine fleck virus-like viruses in *Vitis*. *Arch. Virol.* 145, 553-565
- Salminen, J. P., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pihlaja, K., Pulkkinen, P. (2004): Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavanoid glycosides and proanthocyanidins in oak leaves. *J. Chem. Ecol.* 30/9, 1693-1711
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning – a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 1626 S.
- Savenkov, E. I., Sandgren, M., Valkonen, J. P. T. (1999): Complete sequence of RNA 1 and the presence of tRNA-like structures in all RNAs of Potato mop-top virus, genus pomovirus. *J. of Gen. Virol.* 80, 2779-2784
- Scalbert, A. (1991): Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 12, 3875-3883
- Schiebel, W., Pélissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sängler, H. L., Wassenegger, M. (1998): Isolation of an RNA- direct RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *The Plant Cell* 10, 2087-2101
- Schlag, M. G. (1994): Das europäische Eichensterben und seine Ursachen – von einem phytopathologischen Standpunkt aus gesehen. *Cbl. Ges. Forstwesen* 111, 243-266
- Schmelzer, K., Schmidt, H. E., Schmidt, H. B. (1966): Viruskrankheiten und virusverdächtige Erscheinungen in Forstgehölzen. *Arch. Forstwesen* 15/2, 107-120
- Schmelzer, K. (1972): Das Kirschenblattroll-Virus (Cherry leaf roll virus) aus der Birke (*Betula pendula* Roth). *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2* 127, 10-12
- Schnell, R., Kuhn, D., Quintanilla, W. E. (2001): Sequence diversity among Avocado sunblotch viroids isolated from single avocado trees. *Phytoparasitica* 29, 451-460
- Smith, M. D., Ghosh, S., Dumbroff, E. B., Thompson, J. E. (1997): Characterization of thylakoid-derived lipid-protein particles bearing the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol.* 115/3, 1073-1082
- Snehasis, J., Chiranjib, C., Shyamsundar, N. (2004): Mechanisms and roles of the RNA-based gene silencing. *Electr. J. Biotechnol.* 7/3, <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol7/issue3/full/4/index.html>> Zugriff: 22.08.05

- Steinmüller, S., Bandte, M., Büttner, C. (2004): Untersuchungen zum Erreger der Ringfleckigkeit an Stieleichen (*Quercus robur* L.). *Gesunde Pflanze* 56/1, 11-16
- Steitz, T. A. (1999): DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 17395–17398
- Theilmann, J., Mozafari, J., Reade, R., Wu, Z., Xie, W., Jespersen, G., Bernardy, M., Eastwell, K. C., Rochon, D. (2001): Partial nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of Little cherry virus and development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based diagnostic test. *Virol.* 92/1, 87-98
- Thomas, F. M., Blank, R., Hartmann, G. (2002): Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *For. Pathol.* 32, 277-307
- Thomas, J. E., Dietzgen, R. G. (1991): Purification, characterisation and serological detection of virus-like particles associated with Banana bunchy top disease in Australia. *J. Gen. Virol.* 72, 217-224
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25, 4876-4882
- Thompson, J. R., Leone, G., Lindner, J. L., Jelkmann, W., Schoen, C. D. (2002): Characterisation and complete nucleotide sequence of Strawberry mottle virus: a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses. *J. Gen Virol.* 83, 229-239
- Tuitert, G., Bochen, G. J. (1993): Recovery of resting spores of *Polymyxa betae* from soil and the influence of duration of the bioassay on the detection level of Beet necrotic yellow vein virus in soil. *Neth. J. Pl. Path.* 99 Supplement 3, 219-230
- Turpen, T., Grill, L. K., Garger, S. J. (1988): On the mechanism of cytoplasmic male sterility in the 447 line of *Vicia faba*. *Plant Mol. Biol.* 10, 489-497
- Tzanetakis, I. E., Keller, K. E., Martin, R. R. (2004a): The use of reverse transcriptase for efficient first and second strand cDNA synthesis from single-and double-stranded RNA templates. *J. Virol. Meth.* 124, 73-77
- Tzanetakis, I. E., Halgren, A. B., Keller, K. E., Wintermantel, W. M., Martin, R. R. (2004b): Two criniviruses are associated with the Strawberry pallidosis disease. *Acta Hort. (ISHS)* 656, 21-26
- Valat, L., Mode, F., Mauro, M. C., Burrus, M. (2003): Preliminary attempts to biolistic inoculation of Grapevine fanleaf virus. *J. Virol. Meth.* 108/1, 29-40
- Valverde, R. A., Dodds, J. A., Heick, J. A. (1986): Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. *Phytopathol.* 76, 459-465
- Valverde, R. A., Fontenot, J. F. (1990): Variation in double-stranded ribonucleic acid among pepper cultivars. *J. Americ. Soc. Hort. Sci.* 116, 903-905

- Valverde, R. A., Nameth, S. T., Abdallha, O., Desjardins, P., Dodds, J. A. (1990a): Indigenous double-stranded RNA from pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Sci.* 67, 195-201
- Valverde, R. A., Nameth, S. T., Jordan, R. L. (1990b): Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Dis.* 74, 255-258
- van der Hoeck, L., Boom, R., Goudsmit, J., Snijders, F., Sol, C. J. (1995): Isolation of Human immunodeficiency virus type- 1 (HIV-1) RNA from feces by a simple method and difference between HIV-1 subpopulations in feces and serum. *J. Clin. Microbiol.* 33, 581-588
- Van Loon, L. C. (1987): Disease induction by plant viruses. *Adv. Virus Res.* 33, 205-255
- van Poelwijk, F., Prins, M., Goldbach, R. (1997): Completion of the Impatiens necrotic spot virus genome sequence and genetic comparison of the L proteins within the family Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.* 78, 543-546
- Varga, F. (1987): Erkrankungen und Absterben der Bäume in den Stieleichenbeständen Ungarns. *Österr. Forstzeitung* 98/3, 57-58
- Varny, E. H., Moore, J. D. (1952): Stain of Tomato ringspot virus from American elm. *Phytopathol.* 42, 476-477
- Vives, M. C., Rubio, L., López, C., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M. R., Dawson, W. O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P. (1999): The complete genome sequence of the major component of a mild Citrus tristeza virus isolate. *J. Gen. Virol.* 80, 811-816
- Vogel, R., Siebert, F. (2002): Conformation and stability of alpha-helical membrane Proteins: II. Influence of pH and salts on stability and unfolding of rhodopsin. *Biochemistry* 41, 3536-3445
- Vrati, S., Mann, D. A., Reed, K. C. (1987): Alkaline northern blots: transfer of RNA from agarose gels to Zeta-Probe membrane in dilute NaOH. *Mol. Biol. Rep.* 1, 1-4
- Wakarchuk, D. A., Hamilton, R. I. (1985): Cellular double-stranded RNA in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol. Biol.* 5, 55-63
- Wakarchuk, D. A., Hamilton, R. I. (1990): Partial nucleotide sequence from enigmatic dsRNAs in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol. Biol.* 14/4, 637-639
- Wallace, J. M., Drake, R. J. (1951): Recent developments in studies of quick decline and related diseases. *Phytopathol.* 41, 785-793
- Wan Chow Wah, Y. F., Symons, R. H. (1999): Transmission of viroids via grape seeds. *J. Phytopathol.* 147/5, 285
- Wang, Y., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P., Gal-On, A. (2002): Characterization of synergy between Cucurbit mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathol.* 92, 51-58
- Wang, B., Li, Y. N., Zhang, X. W., Hu, L., Wang, J. Z. (1990): Double-stranded RNA and male sterility in rice. *Theor. App. Genet.* 79, 556-560
- Wang, A. L., Wang, C. C. (1991): Viruses of protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* 45, 251-263

- Werner, R., Mühlbach, H.-P., Büttner, C. (1997): Detection of Cherry leaf roll nepovirus (CLRV) in birch, beech, and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. *Eur. J. For. Pathol.* 27, 309-318
- Wickner, R. B. (1996): Viruses of yeast, fungi and parasitic microorganisms. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (Eds.) 3rd. Ed. *Fields Virology*, Raven Press, NY, 557-585
- Wickner, R. B., Esteban, R., Hilmann, B. I. (2000): Narnaviridae. In: Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C., Bishop, D., Carsten, E., Estes, M., Lemon, S. M., Manllow, J., Mayow, M., McGeoch, D., Pringle, C., Wickner, R. B. (Eds.) *Virus Taxonomy: Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, NY, 651-656
- Wilkins, M. R., Lindskog, I., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D. F., Appel, R. D. (1997): Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS - a World-Wide-Web-accessible tool. *Electrophoresis* 18/3-4, 403-408
- Winter, S., Nienhaus, F. (1989): Identification of viruses from European beech (*Fagus sylvatica* L.) of declining forests in Nordrhein-Westfalia (FRG). *Eur. J. For. Pathol.* 19, 111-118
- Wise, D. J., Carter, G. R., Flores, E. F. (2005): A concise review of veterinary virology. International Veterinary Information Service. Ithaca NY (A3403.0205) <www.ivis.org/docarchive/A3403.0205.pdf> Zugriff: 22.08.05
- Xie, W. S., Antoniwi, J. W., White, R. F. (1989): Detection of Beet cryptic virus 1 and 2 in a wide range of beet plants using cDNA probes. *Plant Pathol.* 38, 527-533
- Xie, W. S., Antoniwi, J. W., White, R. F. (1993): Nucleotide sequence of Beet cryptic virus 3 dsRNA2 which encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 74, 1467-1470
- Yamakawa, K., Nakagomi, O. (1990): Improved detection of rotavirus RNA in dot-blot hybridisation assay by chromatographic extraction and acid denaturation of double stranded RNA. *Moll. Cell. Probes* 4/5, 415-418
- Yarwood, C. E., Hecht-Poiner, E. (1970): A virus resembling Tobacco mosaik virus in oak. *Phytopathol.* 60, 1320
- Yarwood, C. E., Hecht-Poiner, E. (1973): Viruses from rust and mildews. *Phytopathol.* 63, 1111-1115
- Yilmaz, N. D. K., Yanar, Y., Günal, H., Semih, E. (2004): Effects of soil properties on the occurrence of Beet necrotic yellow vein virus and Beet soil-borne virus on sugar beet in Tokat, Turkey. *Plant Pathol. J.* 3/2, 56-60
- Yu, W., Murfett, J., Schoelz, J. E. (2003): Differential induction of symptoms in *Arabidopsis* by P 6 of Cauliflower mosaic virus. *MPMI* 16/1, 35-42
- Zabalgoeazcoa, I. A., Gildow, F. E. (1992): Double-stranded ribonucleic acid in 'Barsoy' barley. *Plant Sci.* 83, 187-194
- Zaitlin, M., Hull, R. (1987): Plant virus-host interactions. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38, 291-315
- Zhang, Y.-P., Uyemoto, J. K., Kirkpatrick, B. C. (1998): Analysis of double-stranded RNAs from cherry trees with stem pitting in California. *Plant Dis.* 82, 871-874

Anhang 1

Probenahmestandorte in Nord- und Mitteldeutschland

Die bonitierten Flächen sind schraffiert gekennzeichnet.

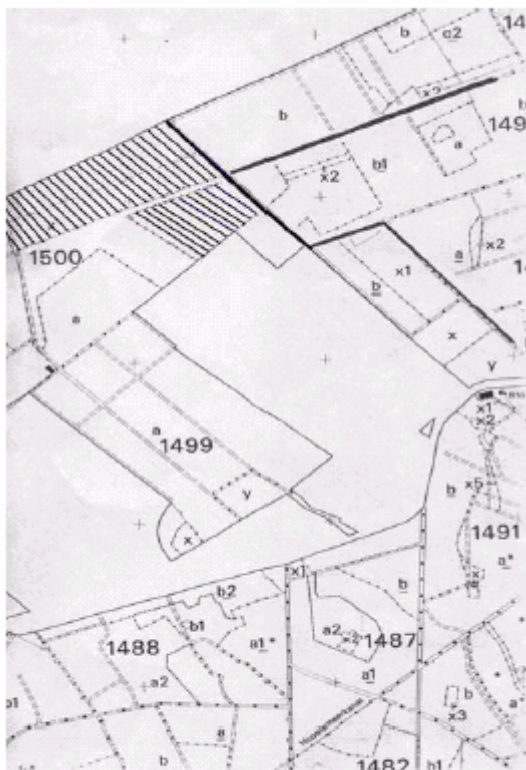


Abb. A 1.1 Probenahmestandort NDS, (FA Neuenburg), RFö Hopels Abt. 1500

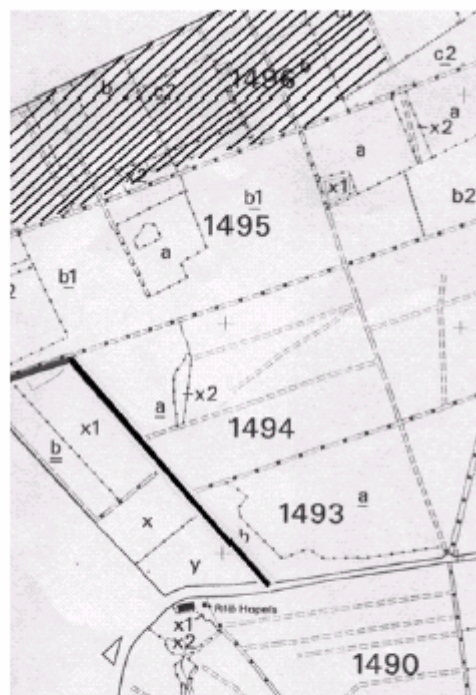


Abb. A 1.2 Probenahmestandort NDS, (FA Neuenburg), RFö Hopels Abt. 1496

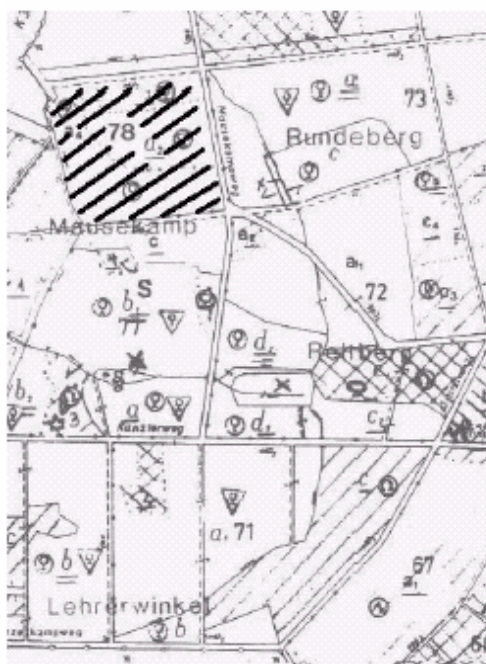


Abb. A 1.3 Probenahmestandort NDS, (FA Braunschweig), RFö Kampen Abt. 78 a²

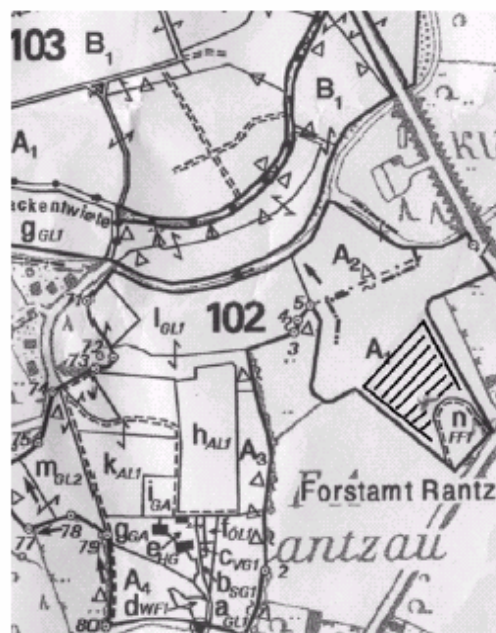


Abb. A 1.4 Probenahmestandort SH, FA Rantzaу, Abt. 102 A 1

11

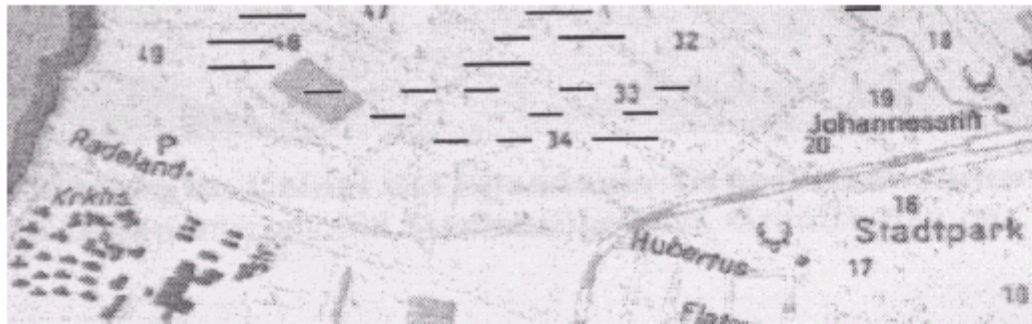


Abb. A 1.9 Probenahmestandort Berlin-Spandau (B 2), RFö Radeland

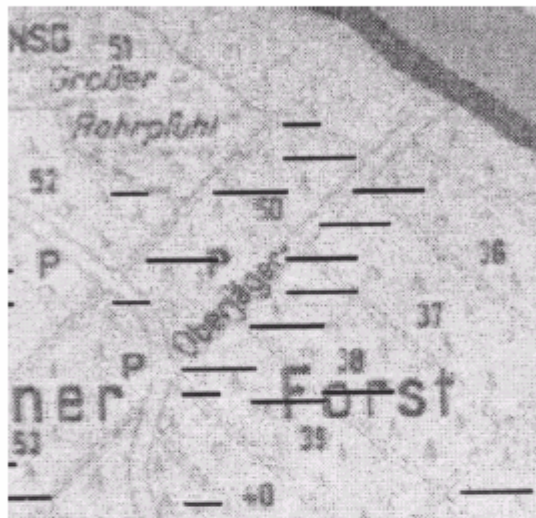


Abb. A 1.10 Probenahmestandort Berlin-Spandau (B 3) RFö Hakenfelde, Oberjägerweg



**Abb. A 1.11 Probenahmestandort Berlin-Grunewald (B 1),
RFö Dachsberg**

Anhang 2

- Nukleotid-Sequenzvergleiche der Tobamovirusisolate E 151 (Transportproteingen) und E 152 (Hüllproteingen) isoliert aus Stieleiche.

TMV-X68110-Seoul-Korea	GTCGTTGATGAGTTTCATGGAAGATGTCCTATGTCAATCAGGCTTGCAAA	50
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	GTCGTTGATGAGTTTCATGGAAGATGTCCTATGTCAATCAGGCTTGCAAA	50
E152	GTCGTTGATGAGTTTCATGGAAGATGTCCTATGTCAATCAGGCTTGCAAA	47
ToMV-X02144-Moscow-Russia	GTTGTTGATGAGTTTCATGGAAGATGTCCTATGTCAATCAGGCTTGCAAA	50
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	GTCGTTGATGAGTTTCATGGAAGATGTCCTATGTCAATCAGGCTTGCAAA	50
	*** *****	
TMV-X68110-Seoul-Korea	GTTTCGATCTCGAACCGGAAAAAGAGTGATGTCCTGTAAGGGAAAAATA	100
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	GTTTCGATCTCGAACCGGAAAAAGAGTGATGTCCTGTAAGGGAAAAATA	100
E152	GTT - CGATCTCGAACCGGAAAAAGAGNAA - GTCCTGTAAGG - AAAATA	93
ToMV-X02144-Moscow-Russia	GTTTCGAACCAAATCCTCAAAAAGAGGTCGAAAAATAATA - - ATAATT	97
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	GTTTCGAACCAAATCCTCAAAAAGAGGTCGAAAAATAATA - - ATAATT	97
	*** ** *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	GTAGTAGTGTTCCGTCAG - TGCCGAACAAGAACTATAGAAATGTCAAGGA	149
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	GTAGTAGTGATCGGTCAG - TGCCGAACAAGAACTATAGAAATGTCAAGGA	149
E152	GTATTAG - GTTCCGTCAG - TGCCGACCAAGACCTATAGAAATGT - AAGGA	140
ToMV-X02144-Moscow-Russia	TAGGTAAGGGCGCTTCAGGCGGAAGGCCTAAACCAAAAAGTTTTGATGAA	147
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	TAGGTAAGGGCGCTTCAGGCGGAAGGCCTAAACCAAAAAGTTTTGATGAA	147
	** * * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	TTTTGGAGGAATGAGTTTTAAAAAGAATAATTTAATC - GATGATGATTCG	198
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	TTTTGGAGGAATGAGTTTTAAAAAGAATAATTTAATC - GATGATGATTCG	198
E152	TTT - GGAGGAGGGAGTTTTAAAAAGATAAAATTTAATCCGATGATGATTCG	189
ToMV-X02144-Moscow-Russia	GTT - - - GAAAAAGAGTTTT - - - - - GATAATTTGATT - GAAGATGAAGCC	186
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	GTT - - - GAAAAAGAGTTTT - - - - - GATAATTTGATT - GAAGATGAAGCC	186
	** * * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	GAGGCTACTGTCGCCGAATCGGATTGTTTTAAATATGTCTTACAGTATC	248
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	GAGGCTACTGTCGCCGAATCGGATTGTTTTAAATATGTCTTACAGTATC	248
E152	GAGTCTACTGTCGCCGAATCGGATTGTTTTAAATATGTCTTACAGTATT	239
ToMV-X02144-Moscow-Russia	GAGACGTCGTCGCCGATTCTGATTGTTAATTAATGTCTTACTCAATC	236
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	GAGACGTCGTCGCCGATTCTGATTGTTAATTAATGTCTTACTCAATC	236
	*** * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	ACTACTCCATCTCAGTTCGTGTTCTTGTCTATCAGCGTGGGCCGACCCAAT	298
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	ACTACTCCATCTCAGTTCGTGTTCTTGTCTATCAGCGTGGGCCGACCCAAT	298
E152	ACTACTCCATCTCAGTTCGTGTTCTTGTCTATCAGCGTGGGCCGACCCAAT	289
ToMV-X02144-Moscow-Russia	ACTTCTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTCTATCTGTATGGGCTGACCOCTAT	286
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	ACTTCTCCATCGCAATTTGTGTTTTTGTCTATCTGTATGGGCTGACCOCTAT	286
	*** *****	
TMV-X68110-Seoul-Korea	AGAGTTAATTAATTTATGTACTAATGCCTTAGGAAATCAGTTTCAAACAC	348
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	AGAGTTAATTAATTTATGTACTAATGCCTTAGGAAATCAGTTTCAAACAC	348
E152	AGAGTTAATTAATTTATGTACTAATGCCTTAGGAAATCAGTTTCAAACAC	339
ToMV-X02144-Moscow-Russia	AGAATTGTTAAACGTTTGTACAAATTCGTTAGGTAACCAAGTTTCAAACAC	336
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	AGAATTGTTAAACGTTTGTACAAATTCGTTAGGTAACCAAGTTTCAAACAC	336
	*** * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	AACAAGCTCGAACTGTCGTTCAAAGACAATTCAGTGAGGTGTGGAAACCT	398
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	AACAAGCTCGAACTGTCGTTCAAAGACAATTCAGTGAGGTGTGGAAACCT	398
E152	AACAAGCTCGAACTGTCGTTCAAAGACAATTCAGTGAGGTGTGGAAACCT	389
ToMV-X02144-Moscow-Russia	AGCAAGCAAGAACTACTGTTCAACAGCAGTTCAGCGAGGTGTGGAAACCT	386
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	AGCAAGCAAGAACTACTGTTCAACAGCAGTTCAGCGAGGTGTGGAAACCT	386
	* * * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	TCACCACAAGTAACGTGTTAGGTTCCCTGACAGTGACTTTAAGGTGTACAG	448
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	TCACCACAAGTAACGTGTTAGGTTCCCTGACAGTGACTTTAAGGTGTACAG	448
E152	TCACCACAAGTAACGTGTTAGGTTCCCTGACAGTGACTTTAAGGTGTACAG	439
ToMV-X02144-Moscow-Russia	TTCCCTCAGAGCACCGTCAGATTTCTGGCGATGTTTATAAGGTGTACAG	436
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	TTCCCTCAGAGCACCGTCAGATTTCTGGCGATGTTTATAAGGTGTATAG	436
	* * * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	GTACAATGCGGTATTAGACCGCTAGTCACAGCACTGTTAGGTGCATTG	498
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	GTACAATGCGGTATTAGACCGCTAGTCACAGCACTGTTAGGTGCATTG	498
E152	GTACAATGCGGTATTAGACCGCTAGTCACAGCACTGTTAGGTGCATTG	489
ToMV-X02144-Moscow-Russia	GTACAATGCAAGTTTTAGATCCTCTAATTACTGCGTTGCTGGGGGCTTTG	486
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	GTACAATGCAAGTTTTAGATCCTCTAATTACTGCGTTGCTGGGGGCTTTG	486

TMV-X68110-Seoul-Korea	ACACTAGAAATAGAATAATAGAAGTTGAAAATCAGGCCGAACCCACGACT	548
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	ACACTAGAAATAGAATAATAGAAGTTGAAAATCAGGCCGAACCCACGACT	548
E152	ACACTAGAAATAGAATAATAGAAGTTGAAAATCAGGCCGAACCCACGACT	539
ToMV-X02144-Moscow-Russia	ATACTAGGAATAGAATAATCGAAGTAGAAAACCGACAGAGTCCGACAACA	536
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	ATACTAGGAATAGAATAATCGAAGTAGAGAACCAGCAGAGTCCGACAACA	536
	* * * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	GCCGAAACGTTAGATGCTACTCGTAGAGTAGACGACGCAACGGTGGCCAT	598
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	GCCGAAACGTTAGATGCTACTCGTAGAGTAGACGACGCAACGGTGGCCAT	598
E152	GCCGAAACGTTAGATGCTACTCGTAGAGTAGACGACGCAACGGTGGCCAT	589
ToMV-X02144-Moscow-Russia	GCTGAAACGTTAGATGCTACCCGACAGGTTAGACGACGCTACGGTTGCAAT	586
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	GCTGAAACGTTAGATGCTACCCGACAGGTTAGACGACGCTACGGTTGCAAT	586
	** * * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	AAGGAGCGCGATAAATAATTTAATAGTAGAATTGATCAGAGGAACCGGAT	648
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	AAGGAGCGCGATAAATAATTTAATAGTAGAATTGATCAGAGGAACCGGAT	648
E152	AAGGAGCGCTATAAATAATTTAATAGTAGAATTGATCAGAGGAACCGGGT	639
ToMV-X02144-Moscow-Russia	TCGGTCTGCTATAAATAATTTAGTTAATGAAGTAAAGAGGTAAGTGGAC	636
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	TCGGTCTGCTATAAATAATTTAGTTAATGAAGTAAAGAGGTAAGTGGAC	636
	** * * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	CTTATAATCGGAGCTCTTTCGAGAGCTCTTCTGGTTTGGTTTGGACCTCT	698
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	CTTATAATCGGAGCTCTTTCGAGAGCTCTTCTGGTTTGGTTTGGACCTCT	698
E152	CTTATAATCGGAGCTCTTTCGAGAGCTCTTCTGGTTTGGTTTGGAACTCT	689
ToMV-X02144-Moscow-Russia	TGTACAATCAGAATACTTTTGAAGTATGTCTGGTTTGGTTCTGGACCTCT	686
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	TGTACAATCAGAATACTTTTGAAGTATGTCTGGTTTGGTTCTGGACCTCT	686
	** * * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	GGTCCTGCAACTTGAGGTAGTCAAGATGCATAATAAATAACGGATTGTGT	748
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	GGTCCTGCAACTTGAGGTAGTCAAGATGCATAATAAATAACGGATTGTGT	748
E152	GGTCCTGCAACTTGAGGTAGTCAAGATGCATAATAAATAACGGATTGTGT	739
ToMV-X02144-Moscow-Russia	GCACCTGCATCTTAAAT--GCATAGGTGC-TGAAATATAA-AGTTTGTGT	732
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	GCACCTGCATCTTAAAT--GCATAGGTGC-TGAAATATAA-AGTTTGTGT	732
	* * * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	CCGTAAT-CACACGTGGTGCGTACGATAACGCATAGTGTCTTTCCCTCCA	797
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	CCGTAAT-CACACGTGGTGCGTACGATAACGCATAGTGTCTTTCCCTCCA	797
E152	CCGTAAT-CACACGTGGTGCGTACGATAACGCATAGTGTCTTTCCCTCCA	788
ToMV-X02144-Moscow-Russia	TTCTAAAACACACGTGGTACGTACGATAACGTACAGTGTCTTTCCCTCCA	782
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	TTCTAAAACACACGTGGTACGTACGATAACGTACAGTGTCTTTCCCTCCA	782
	*** * * * *	
TMV-X68110-Seoul-Korea	CTTAAAT	804
TMV-AJ429078-Hamburg-Germany	CTTAAAT	804
E152	CTTAAAT	795
ToMV-X02144-Moscow-Russia	CTTAAAT	789
ToMV-AJ429085-Hamburg-Germany	CTTAAAT	789

Abb. A 2.1 Nukleotid-Sequenzvergleich der Hüllproteinproteinsequenz des Isolates E 152 mit TMV und ToMV Hüllproteinsequenzen mit Hilfe des Alignmentprogramms CLUSTAL W (1.82). Die unterstrichenen Sequenzabschnitte im Isolat E 152 sind die Primersequenzen Tob-Uni 1 und Tob-Uni 2. Sequenzen des TMV sind blau gekennzeichnet.

E151	<u>GATCTGTC</u> CAAAAGTCTGAGAAACTTCTACCGTCGATGTTCAACGCTGTAAA 50
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	GATCTGTCAAAGTCTGAGAAACTTCTCCCGTCAATGTTCAACGCTGTAAA 50
ToMV-X02144-Moskau-Russland	<u>GATCTGTC</u> CAAAAGTCTGAGAAACTTCTCCCGTCGATGTTCAACGCTGTAAA 50
TMV-X68110-Seoul-Korea	GACCTGACAAAATGGAGAAGATCTTACCGTCGATGTTTACCGCTGTAAA 50
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	GACCTGACAAAATGGAGAAGATCTTACCGTCGATGTTTACCGCTGTAAA 50
	** **
E151	GAGTGTTATGGTTTCAAAGGTTGATAAGATTATGGTCCATGAAAATGAAT 100
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	GAGTGTTATGGTTTCAAAGGTTGATAAGATTATGGTCCATGAAAATGAAT 100
ToMV-X02144-Moskau-Russland	<u>GAGTGTTATGGTTTCAAAGGTTGATAAGATTATGGTCCATGAAAATGAAT</u> 100
TMV-X68110-Seoul-Korea	GAGTGTCATGTGTTCAAAGTTGATAAAATAATGGTTCATGAGAATGAGT 100
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	GAGTGTTATGTGTTCCAAAGTTGATAAAATAATGGTTCATGAGAATGAGT 100

E151	CATTGCTGAACTAAATCTCTTAAAAGGTGTAAACTTATAGAAGGTGGG 150
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	CATTGCTGAACTAAATCTCTTAAAAGGTGTAAACTTATAGAAGGTGGG 150
ToMV-X02144-Moskau-Russland	<u>CATTGCTGAACTAAATCTCTTAAAAGGTGTAAACTTATAGAAGGTGGG</u> 150
TMV-X68110-Seoul-Korea	CATTGTCAGAGGTGAACCTTCTTAAAAGGAGTTAAGCTTATTGATAGTGA 150
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	CATTGTCAGAGGTGAACCTTCTTAAAAGGAGTTAAGCTTATTGATAGTGA 150

E151	TATGTTTGCTTAGTTGGTCTTGTGTGTCGCGTGAGTGGAATTTACCAGA 200
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	TATGTTTGCTTAGTTGGTCTTGTGTGTCGCGTGAGTGGAATTTACCAGA 200
ToMV-X02144-Moskau-Russland	<u>TATGTTTGCTTAGTTGGTCTTGTGTGTCGCGTGAGTGGAATTTACCAGA</u> 200
TMV-X68110-Seoul-Korea	TACGTCTGTAGTCCGGTTTGGTGTGTCACGGGCGAGTGGAATTTGCTGA 200
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	TACGTCTGTAGTCCGGTTTGGTGTGTCACGGGCGAATGGAATTTGCTGA 200
	** **
E151	TAATTGCGGTGGTGGTGTGAGTGTCTGTCATGGTTGACAAAGAGAATG3AAA 250
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	TAATTGCGGTGGTGGTGTGAGTGTCTGTCATGGTTGACAAAGAGAATG3AAA 250
ToMV-X02144-Moskau-Russland	<u>TAATTGCGGTGGTGGTGTGAGTGTCTGTCATGGTTGACAAAGAGAATG3AAA</u> 250
TMV-X68110-Seoul-Korea	CAATTGACAGAGGAGGTGTGAGCGTGTGTCTGGTGGACAAAAGGATG3AAA 250
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	CAATTGACAGAGGAGGTGTGAGCGTGTGTCTGGTGGACAAAAGGATG3AAA 250

E151	GAGCGGACGAAAGCCGCACTGGGGTCATATTACACTGCTGCTGCTAAAAAG 300
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	GAGCGGACGAAAGCCGCACTGGGGTCATATTACACTGCTGCTGCTAAAAAG 300
ToMV-X02144-Moskau-Russland	<u>GAGCGGACGAAAGCCGCACTGGGGTCATATTACACTGCTGCTGCTAAAAAG</u> 300
TMV-X68110-Seoul-Korea	GAGCGGACGAGGCCACCTCTCGGATCTTACTACACAGCAGCTGCAAAAGAAA 300
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	GAGCGGACGAGGCCACTCTCGGATCTTACTACACAGCAGCTGCAAAAGAAA 300

E151	CGGTTTCAGTTTANAGTGGTCCCAAATTACGGTATTACAACAAAGGATGC 350
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	CGGTTTCAGTTTAAAGTGGTCCCAAATTACGGTATTACAACAAAGGATGC 350
ToMV-X02144-Moskau-Russland	<u>CGGTTTCAGTTTAAAGTGGTCCCAAATTACGGTATTACAACAAAGGATGC</u> 350
TMV-X68110-Seoul-Korea	AGATTTTCAGTTTCAAGGTCGTTCCCAAATTATGCTATAACCACCCAGGACGC 350
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	AGATTTTCAGTTTCAAGGTCGTTCCCAAATTATGCTATAACCACCCAGGACGC 350

E151	AGAAAAGAACATATGGCAGGTCTTAGTAAATATTAATAATGTAATAATGA 400
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	AGAAAAGAACATATGGCAGGTCTTAGTAAATATTAATAATGTTAAATGA 400
ToMV-X02144-Moskau-Russland	<u>AGAAAAGAACATATGGCAGGTCTTAGTAAATATTAATAATGTAATAATGA</u> 400
TMV-X68110-Seoul-Korea	GATGAAAACGTCGGCAAGTTTATAGTAAATATTAGAAATGTAAGATGT 400
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	GATGAAAACGTCGGCAAGTTTATAGTAAATATTAGAAATGTAAGATGT 400
	** **
E151	GTGCGGGCTACTGCCCTTTGTCTATTAGAATTTGTGTCTGTGTATTGTT 450
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	GTGCGGGCTACTGCCCTTTGTCTATTAGAATTTGTGTCTGTGTATTGTT 450
ToMV-X02144-Moskau-Russland	<u>GTGCGGGCTACTGCCCTTTGTCTATTAGAATTTGTGTCTGTGTATTGTT</u> 450
TMV-X68110-Seoul-Korea	CAGCGGGTTTCTGTCCGCTTTCTCTGAGTTTGTGTCTGGTGTGTATTGTT 450
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	CAGCGGGTTTCTGTCCGCTTTCTCTGAGTTTGTGTCTGGTGTGTATTGTT 450

E151	TATAAAAATAATATAAAATTGGGTTTGAGGGAGAAAGTAACGAGTGTGAA 500
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	TATAAAAATAATATAAAATTGGGTTTGAGGGAGAAAGTAACGAGTGTGAA 500
ToMV-X02144-Moskau-Russland	<u>TATAAAAATAATATAAAATTGGGTTTGAGGGAGAAAGTAACGAGTGTGAA</u> 500
TMV-X68110-Seoul-Korea	TATAGAAAATAATATAAAATTAGGTTTGAGAGAGAAAGATTACAAACGTGAG 500
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	TATAGAAAATAATATAAAATTAGGTTTGAGAGAGAAAGATTACAAACGTGAG 500

E151	CGATGGAG 508
ToMV-AF042032-Quebec-Canada	CGATGGAG 508
ToMV-X02144-Moskau-Russland	CGATGGAG 508
TMV-X68110-Seoul-Korea	AGACGGAG 508
ToMV-AF042033-Quebec-Canada	-----

Abb. A 2.2 Nukleotid-Sequenzvergleich der Transportproteinsequenz des Isolates E 151 mit TMV und ToMV Transportproteinsequenzen mit Hilfe des Alignmentprogramms CLUSTAL W (1.82). Die unterstrichen Sequenzabschnitte im Isolat E 151 sind die Primersequenzen ToMV 5 und ToMV 6. Sequenzen des ToMV sind blau gekennzeichnet.

Anhang 3

Nukleotid-Sequenzvergleiche der aus eichenassoziiierter dsRNA gewonnenen Klone 1,12 und 13 mit der Sequenz der RdRp des BCV 3.

```

Klon 1: 360 CAGTTTTATGTGAACAAGAAC-TCGAGGGTTGGGCTAGAAGCTTTTACACCTTGGAGGGA 302
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3: 253 CAGTGCTATACGAGCAAGTCTGTCAAGGAT-GGGCTAGAAGCTTCTACACCCTAGAGGGG 311

Klon 1: 301 CACATGAACGCGATTTTAGCGTATGCTACA-CCCGACACACCATTTCGCAGC-TGTCAACT 244
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3: 312 CACATGCAAGCTATTCTCGCATACGC-ACAACCCGACACTCCAAGGAAACCTTTGACCA 370

Klon 1: 243 TCTCAGTCTATAAACTGCGGTGCGAC-GCTGTACAGAATGAGTTACGTAGCCTTCCGATA 185
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3: 371 AACCATTGTTGGATCAG-GCATAC-ACTGCCGTCCAGAATGAGTTACGTAGCCTTCCAAAA 428

Klon 1: 184 ACGAGGGCATTGATGTGCTTACTGAGCTTCATCTAGTCAAATATGAGCAGTCTCTGCA 125
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3: 429 GCGAGGGCATTGATGTTAATACTGAACCTTGACAAAGTTCCATATGAGCAGTCTCTCTCA 488

Klon 1: 124 GCAGGCTACGACTATA-TAGGCCCCAAAGGACCTATTGAGGGAGATAAACCACAAGAGGGC 66
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3: 489 GCAGGATATGGCTATCGTAGTTCAC-AAGGGACCACCCGAGGCGAGACCCATATGAGGGC 547

Klon 1: 65 AATCAAGAGAGCTAAAGCGACTTTCTGGTCGGCGATACAGACCC--T-AACAAGGACCG- 10
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3: 548 TATCAGTAGAGTTAAACCTACTCTGATGACGGCGATA-AGGCCAGATGAAGAAGGACCGG 606

Klon 1: 9 A-TACGAATA 1
          ||||| |||||
BCV 3: 607 AATAC-ACTA 615

```

Abb. A 3.1 Nukleotid-Sequenzvergleich des aus dsRNA der Probe E 841 gewonnen Klon 1 mit der RdRp des BCV 3 mit Hilfe der Sequenzdatenbank NCBI-BLAST 2.

```

Klon 12 1 -----TCTATGTTACTCA 14
          ||||| ||||| |||||
BCV3 1100 CTTGGAATCGAATATATATGGAGAGTACTATTTTCGAGATCACCCCATCGGTGTTACACCCA 1162

Klon 12 15 AGGTGATGACTCATTAAATAGGTGAAACAGAAATACACGAACCCAGAGAGTTTGGCAGAAATAG 76
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3 1163 AGGTGACGATTTCATTAAATCGGCGAGACTTTTCTCGTTGAACAGAAACGGTCGCCCGGAAG 1224

Klon 12 77 CAAAACCGCTTAACTGGTATCTCAATCCAGCTAAGACTGAAACTTCGAGGTCAATCGAATAT 138
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3 1125 CGGCGAAGTATGGATGGATAATGAACCTGATAAGACAGAATACTCTACAGATCCAGGATAT 1286

Klon 12 139 GTGACCTTCTTAGGGAGAATCCTATGGAGGACTGAACCAAAGAGATCTTAAACGATGTCT 200
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3 1287 GTCACATTCTTAGGAAGAACGGCACATGGATTATGAACGCTAGATCACTAGACAAATGTCT 1348

Klon 12 201 GAGGCTCTTAATATTCCAGAGTACCCCGTTGATTCCGGACGGATTTTCAGCTTTTCGAGCGC 262
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3 1349 GAGACTTCTAATGTTTCTGAGTACCCTGTAACCTTCAGGGCGGATTTCCGCCTATAGAGCAG 1410

Klon 12 263 ATTCAATTGCAAACGACGCGAGGAAACACCAGCGAAGTATTGAACACGATCGCAAAGCGTCTT 324
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3 1411 AGTCAATTGCAAGAGATTGCGGAGGACTTAGCGAGGTAATAAATCTCGTAGCTCGTAGATTA 1472

Klon 12 325 AGACGTAAGTACGGCATGGCTGAAGCCAATGAAGTACCTAGACAACCTTAGGCCATATATAAT 386
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3 1473 CGTAGACAATACGGAGTAGCTAGTGAGGACGAAGTCCCACATTACTTTAAACGTTATGTAGC 1534

Klon 12 387 GTAATTATAAATGTAATTATAATTTTCATTATGAGCTTAATAAAACGTCTTGACAAGCTTG 448
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
BCV 3 1535 TTAATTTTGTGTTGTAATGA--ACTCTTTTAATAAACATAATAAAGTTCTACGGAAAGGGCT 1596

```

Abb. A 3.2 Nukleotid-Sequenzvergleich des aus dsRNA der Probe E 545 a gewonnen Klon 12 mit der RdRp des BCV 3 mit Hilfe der Sequenzdatenbank NCBI-BLAST 2.

VIII

Anhang 4

Tab. A 1: Übersicht über verwendetes Probenmaterial und die Ergebnisse der Untersuchungen unter Angabe des Probenmaterials, der Symptomausprägung der Herkunft, des Zeitpunktes der Probenahme sowie der Lagerung

Die Spalte "Besonderh." =Besonderheiten wurde nur auf den Seiten eingefügt, wo Proben mit Besonderheiten aufgeführt waren.
 Abt. Abteilung, amerik.: amerikansche, B: Berlin, Besonderh.: Besonderheiten, chlor.: chlorotisch, DD: Dresden, dist.: distinkt, dsRNA: Doppelstrang RNA, EM: Elektronenmikroskopie, FA: Forstamt, fadenf.: fadenförmig, P.: Partikel, gesRNA: gesamt RNA, HH: Hamburg, inf.: infiziert, isom.: isometrisch, Lagerbed.: Lagerbedingungen, MV: Mecklenburg-Vorpommern, NDS: Niedersachsen, NRW: Nordrhein-Westfalen, pulv.: pulverisiert, RFö: Revierförsterei, SN: Sachsen, Stk: Stück, stäbchenf.: stäbchenförmig, SWH: Schleswig-Holstein

Probe	Wirt	Proben-material	Symptom-ausprägung	Herkunft	Zeitpunkt der Probenahme	Lager-bed.	Besonderh.	Verwendung/Ergebnis
E 130	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 15 g	Ringflecken	B 3	07/06/2001	-20°C		Inokulation: - EM: isom. P. 30-40 nm (Kap. 3.3) ELISA: -
E 146	Stieleiche Mischprobe	Blätter 20 g	Ringflecken	NRW, Erhaltungs-samenplantage FA Hilchenbach	06/06/2001	-20°C		Inokulation: - EM: - ELISA: -
E 148	Stieleiche Mischprobe	Blätter 40 g	Ringflecken	NRW, FA Arnsberg, Abt. 290 A3	07/06/2001	-20°C	Vergesell-schaftung mit CLRV inf. Gehölzen	Inokulation: - EM: - Virusreinigung (REBENSTORF, 2002):-
E 149	Stieleiche Mischprobe	Blätter 15 g	Ringflecken	NRW, FA Arnsberg, Abt. 289 B4	07/06/2001	-20°C		Inokulation: - EM: - ELISA: -
E 151	Stieleiche Mischprobe	Blätter 110 g	Ringflecken	NRW, FA Arnsberg, Abt. 290 A3	14/06/2001	-20°C	Vergesell-schaftung mit CLRV inf. Gehölzen	Inokulation: - EM: isom. P. 30-40 nm (Kap. 3.3) Virusreinigung (REBENSTORF, 2002): isom. P. 25-85 nm (Kap. 3.4.1) Reinigung (HENTSCH, 1998): stäbchenf. P. 350 nm PCR: ToMV (Kap. 3.4.3)
E 152	Stieleiche Mischprobe	Blätter 270 g	Ringflecken	NRW, FA Arnsberg, Abt. 290 B3	14/06/2001	-20°C	großes Probenahme-volumen	Inokulation/EM: - Virusreinigung (HENTSCH, 1998): stäbchenf. Viruspartikel 400 nm PCR: TMV (Kap. 3.4.3)

Probe	Wirt	Probenmaterial	Symptomausprägung	Herkunft	Zeitpunkt der Probenahme	Lagerbed.	Besonderh.	Verwendung/Ergebnis
E 153	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	Scheckungen	NRW, FA Arnsberg, Abt. 290 B3	14/06/2001	-20°C	auffällige Symptomausprägung	Inokulation: - EM: - Virusreinigung (HENTSCH, 1998):-
E 1993	Stieleiche	Blätter 70 g	symptomlos	unbekannt	10/1993	-20°C		Inokulation: - EM: - Virusreinigung (HENTSCH, 1998):-
E 1997	Stieleiche	Blätter 120 g	symptomlos	NRW, Hauberg (Kreuztal)	09/09/1997	-20°C		Virusreinigung (HENTSCH, 1998):- Inokulation: - EM:- ELISA:- dsRNA-Isolierung: -
E 338	Stieleiche Baum B	Eicheln 20 Stk.	mit Symptomen	B 3	03/12/2001	-		Aussaat: symptomlos gesRNA (BOOM et al., 1990): + (Kap. 3.5.1)
E 339	Stieleiche Baum C	Eicheln 20 Stk.	mit Symptomen	B 3	03/12/2001	-		Aussaat: symptomlos
E 340	Stieleiche Baum D	Eicheln 30 Stk.	mit Symptomen	B 3	03/12/2001	-		Aussaat: symptomlos EM: isom. P. 30-40 nm (Kap.3.3) Inokulation (frisch): symptomlos
E 341	Stieleiche Baum G	Eicheln 20 Stk.	mit Symptomen	B 3	03/12/2001	-		Aussaat: chlorotische Ringflecken an Blättern eines Sämlings (Kap. 3.2)
E 342	Stieleiche Einzelbaum	Eicheln 20 Stk.	symptomlos	B 3	03/12/2001	-		Aussaat: symptomlos gesRNA-Isolierung (Boom et al., 1990): + (Kap. 3. 5.1)
E 343	Stieleiche Einzelbaum	Eicheln 20 Stk.	symptomlos	B 3	03/12/2001	-		Aussaat: symptomlos

Probe	Wirt	Probenmaterial	Symptomausprägung	Herkunft	Zeitpunkt der Probenahme	Lagerbed.	Besonderh.	Verwendung/Ergebnis
Baum A B 3	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 70 g	Ringflecken	B 3	03/08/2001	-20°C	Isolierung isom. P. (30-40) nm inach Voruntersuchungen	EM:- Inokulation: - Virusreinigung (HENTSCH,1998):-
Reiser	Stieleiche Mischprobe	8 Triebe	mit Symptomen	B 3	01/02/2002	GWH		Inokulation (frisch): -
E 533	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 74 g	Ringflecken	B 3	18/06/2002	-20°C	auffällige Symptomausprägung	Virusreinigung (DIJKSTRA et al., 1996): - EM: - Inokulation (frisch): - dsRNA-Isolierung: 1,8/2,0 kb; 1,2 kb; 0,9 kb; 0,7 kb
E 534 a	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 70 g	symptomlos	B 1	16/08/2002	-20°C		Virusaufreinigung (HENTSCH, 1998): - EM: - Inokulation (frisch): - dsRNA-Isolierung: 1,8 u. 2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 538	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 21 g	Ringflecken und Chlorosen	B 3	16/08/2002	-20°C	auffällige Symptomausprägung	dsRNA-Isolierung: -
E 545 a	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 1	24/06/2002	-20°C		dsRNA-Isolierung: 1,5/ 1,6 kb (Kap. 3.5.2) cDNA Klonierung: RdRp <i>Pyrus</i> , BCV 3 (Kap. 3.5.3)
E 551	Stieleiche Baum 7	Blätter 20 g	Ringflecken, Mehltau	NRW, FA Arnsberg, Abt. 290 A1	27/06/2002	-20°C		dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb

Probe	Wirt	Probenmaterial	Symptomausprägung	Herkunft	Zeitpunkt der Probenahme	Lagerbed.	Besonderh.	Verwendung/Ergebnis
E 552	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 100 g	Ringflecken	NRW, FA Arnsberg, 290 B5	27/06/2002	-20°C	großes Probenahmevolumen	Virusreinigung (HENTSCH, 1998): - Inokulation: - EM: isom. P. 30-40 nm (Kap. 3.3)
E 555	Stieleiche Baum 5	Blätter 20 g	Ringflecken, Chlorosen	NRW, Hauberg (Kreuztal)	27/06/2002	-20°C	auffällige Symptomausprägung	dsRNA-Isolierung: -
E 561	Stieleiche Baum 3	Blätter 12 g	Ringflecken	NRW, FA Arnsberg, 290 B5	26.27/06/2002	-20°C	Einzelbaumprobe	dsRNA-Isolierung:-
E 587	Stieleiche Einzelbaum	Blätter	Ringflecken	SWH, FA Rantzau, Abt. 102 A1	04/07/2002	-20°C		Inokulation (frisch): -
E 594	Stieleiche Mischprobe	Blätter 40 g	Ringflecken, stark chlorot.	SN, FA DD-Nord, Abt. 250 a ²	09/07/2002	-20°C	auffällige Symptomausprägung	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb
E 605	Stieleiche	Blätter 50 g	symptomlos	SN, FA DD-Nord, Abt. 250 a ²	15/07/2002	-20°C		dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb
E 617	Stieleiche Baum 2	Blätter 60 g	sehr kleine Ringe, viele pro Blatt	NDS, RFö Kampen, Abt.78 A 2	19/07/2002	-20°C		EM: - Inokulation: -
E 617	Stieleiche Baum 2	Knospen 3 g		NDS, RFö Kampen, Abt.78 A 2	19/07/2002	-20°C		EM: - Inokulation: -
E 619	Stieleiche Baum 3	Blätter 95 g	Mosaik	NDS, RFö Kampen, Abt.78 A 2	18/07/2002	-20°C	auffällige Symptomausprägung	Inokulation (frisch): - EM: isom. P. 30-40 nm, stäbchenf. P. 120 nm (Kap. 3.3) Virusreinigung (HENTSCH, 1998): fadenf. P. 120-400 nm (Kap. 3.4.1)

Probe	Wirt	Proben-material	Symptom-ausprägung	Herkunft	Zeitpunkt der Probenahme	Lager-bed.	Besonderh.	Verwendung/Ergebnis
E 630	Stieleiche Mischprobe	Blätter 5 g	Ringflecken	NDS, RFö Hopels, Abt. 1500 A	31/07/2002	-20°C		Inokulation (frisch): -
E 631	Stieleiche Baum A	Blätter 5 g	Ringflecken	NDS, RFö Hopels, Abt. 1496 C2	31/07/2002	-20°C		Inokulation (frisch): -
E 632	Stieleiche Baum B	Blätter 5 g	Ringflecken, dist. chlor. Läsionen	NDS, RFö Hopels, Abt. 1496 B	31/07/2002	-20°C		Inokulation (frisch): - EM: flexibles Partikel ca 450 nm (Kap. 3.3)
E 633	Stieleiche Mischprobe	Blätter 384 g	dist. chlor. Läsionen	NDS, RFö Hopels, Abt. 1496 C 2	31/07/2002	-20°C		Inokulation (frisch): -
E 634	Stieleiche Baum C	Blätter 74 g	Ringflecken, teilweise nekrotisiert	NDS, RFö Hopels, Abt. 1496 B	31/07/2002	-20°C		Inokulation (frisch): -
E 635	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 74 g	symptomlos	HH, SF Klövensteen	31/07/2002	-20°C		Inokulation (frisch): -
E 636	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 87 g	Mosaik	NDS, RFö Hopels, Abt. 1496 B	31/07/2002	-20°C		Inokulation (frisch): -
E 637	Stieleiche Baum D1	Blätter 82 g	Ringflecken, dist. chlor. Läsionen	HH, SF Klövensteen	31/07/2002	-20°C		Inokulation (frisch): -
E 651	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 10 g	nekrotische Flecken	Herr Dr. Lehmann	20/08/2002	-20°C	auffällige Symptom-ausprägung	Inokulation (frisch): - EM: -
E 807	Stieleiche Mischprobe	Rinde 16 g	mit Symptomen	B 1	31/03/2003	-80°C		gesRNA-Isolierung (BOOM et al., 1990/DELLAPORTA et al., 1983): + (Kap. 3.5.1) dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb (Kap. 3.5.2)

Probe	Wirt	Proben-material	Symptom-ausprägung	Herkunft	Zeitpunkt der Probenahme	Lager-bed.	Verwendung/Ergebnis
E 808	Stieleiche Mischprobe	Knospen 8 g	mit Symptomen	B 1	31/03/2003	-80°C	gesRNA-Isolierung (BOOM et al. 1990/DELLAPORTA et al,1983): + (Kap. 3.5.1) dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 814	Stieleiche Mischprobe	Rinde 14,4 g	mit Symptomen	SN, FA DD-Nord, Abt. 250 a ²	22/04/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2) EM: -
E 815	Stieleiche Mischprobe	Knospen 10 g	mit Symptomen	SN, FA DD- Nord, Abt. 250 a ²	22/04/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: - EM: -
E 820	Stieleiche	Rinde 16 g	symptomlos	B 1	22/04/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: -
E 823	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	symptomlos	B 1	22/05/2003	pulv. -80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 824	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	symptomlos	B 1	22/05/2003	pulv. -80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2) cDNA Klonierung: -
E 825	Stieleiche Mischprobe	Blätter 90 g	Ringflecken	B 1	22/05/2003	pulv. -80°C	Trockeninokulation: - dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap.3.5.2)
E 826	Stieleiche Mischprobe	Blätter 40 g	Ringflecken, dist. chlor. Läsionen	SN, FA DD-Nord, Abt. 250 a ²	26/05/2003	pulv. -80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 827	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 40 g	symptomlos	SN, FA DD-Nord, Abt. 250 a ²	26/05/2003	pulv. -80°C	dsRNA-Isolierung: -

Probe	Wirt	Probenmaterial	Symptomausprägung	Herkunft	Zeitpunkt der Probenahme	Lagerbed.	Besonderh.	Verwendung/Ergebnis
E 828	Amerikanische Roteiche Einzelbaum	Blätter 50 g	symptomlos	SN, FA DD-Nord, Abt. 250 a ²	26/05/2003	-80°C	andere Eichenart	dsRNA-Isolierung: 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2) DOP-PCR:-
Baum 66	Stieleiche	Blätter 50 g	Ringflecken	NRW, Hauberg (Kreuztal)	12/06/2003	-80°C		dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb (Kap. 3.5.2) cDNA Klonierung: -
Baum A NRW	Stieleiche	Blätter 50 g	Ringflecken	NRW, FA Arnsberg, Abt. 289 B1	13/06/2003	-80°C		dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb DOP-PCR: RdRp <i>Pyrus</i> , BCV 3 (Kap. 3.5.3)
E 835	Stieleiche Mischprobe	Blätter 30 g	Ringflecken	B 1	01/06/2003	-80°C		dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 841	Stieleiche Mischprobe	Blätter 150 g	Ringflecken	NDS, RFö Hopels, Abt. 1500 A	05/06/2003	-80°C		dsRNA-Isolierung: 5,0 kb, 1,8/2,0 kb, 1,7 kb, 1,5/1,6 kb (Kap. 3.5.2) cDNA Klonierung: RdRp <i>Pyrus</i> , BCV 3 (Kap. 3.5.3)
E 842	Stieleiche Mischprobe	Blätter 150 g	Ringflecken	NDS, RFö Hopels, Abt. 1496	05/06/2003	-80°C		dsRNA-Isolierung: -
E 863	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 5 g	Ringflecken	B 1	16/06/2003	-		Inokulation (frisch): - Trockeninokulation: -
E 878	Stieleiche Mischprobe	Blätter 500 g	Ringflecken, dist. Läsionen	SN, FA DD-Nord, Abt. 250 a ²	22/06/2003	-80°C		dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 881	Stieleiche Mischprobe	Blätter 196 g	Ringflecken	B 3	24/06/2003	frisch -80°C		dsRNA-Isolierung: - Inokulation: - gesRNA-Isolierung (BOOM et al. 1990): +
E 884	Stieleiche Baum C	Blätter 50 g	Ringflecken	B 3	24/06/2003	-80°C		dsRNA-Isolierung: - gesRNA-Isolierung: + (Kap. 3.5.1)

Probe	Wirt	Proben-material	Symptom-ausprägung	Herkunft	Zeitpunkt der Probenahme	Lager-bed.	Verwendung/Ergebnis
E 885	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	Ringflecken	B 3	24/06/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: -
E 886	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	Ringflecken	B 2	24/06/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 929	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	HH, SF Klövensteen	30/06/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: -
E 944	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 1	11/07/2003	-80°C	Inokulation (frisch): - dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2) DOP-PCR: -
E 948	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 1	18/07/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 949	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	symptomlos	B 1	18/07/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: -
E 971	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 1	01/08/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: -
E 972	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	symptomlos	B 1	01/08/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 974	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 1	15/08/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 975	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	symptomlos	B 1	15/08/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 1110	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 1	29/08/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: -
E 1111	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	symptomlos	B 1	29/08/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: -
E 1144	Stieleiche Mischprobe	Rinde 5 g	mit Symptomen	B 1	01/10/2003	pulv. -80°C	Trockeninokulation (frisch): - gesRNA-Isolierung BOOM et al. (1990): + (Kap. 3.5.1)
E 1145	Stieleiche Mischprobe	Blätter 10 g	Ringflecken	B 1	01/10/2003	-80°C	gesRNA-Isolierung BOOM et al. (1990): + (Kap. 3.5.1)

Probe	Wirt	Proben-material	Symptom-ausprägung	Herkunft	Zeitpunkt der Probenahme	Lager-bed.	Verwendung/Ergebnis
E 1153	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 1	09/10/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 1154	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 1	09/10/2003	-80°C	Inokulation (frisch): - dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2) cDNA Klonierung: -
E 1155	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 3	09/10/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 1155	Stieleiche Mischprobe	Rinde 5 g	mit Symptomen	B 3	09/10/2003		Trockeninokulation (frisch): -
E 1156	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 3	09/10/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb
E 1157	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 2	09/10/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: -
E 1158	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	symptomlos	B 1	09/10/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb
E 1159	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	symptomlos	B 1	09/10/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 1160	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 2	17/10/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 1161	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 1	17/10/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: -
E 1162	Stieleiche Mischprobe	Blätter 50 g	Ringflecken	B 3	17/10/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: -
E 1163	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 50 g	symptomlos	B 1	17/10/2003	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb (Kap. 3.5.2)
E 1584	Stieleiche Mischprobe	Rinde 30 g	Ringflecken	B 1	12/02/2004	-	Nukleokapsidisolierung: Protein 54 kda, isom P. 25 nm in Fraktion 2 (Kap. 3.4.2)

Probe	Wirt	Proben-material	Symptom-ausprägung	Herkunft	Zeitpunkt der Probenahme	Lager-bed.	Verwendung/Ergebnis
E 1722	Stieleiche Mischprobe	Blätter 80 g	Ringflecken, teilweise nekrotisiert	NDS, RFö Hopels, Abt. 1500 A	31/05/2004	-80°C	dsRNA-Isolierung: 1,5/1,6 kb und 1,8/2,0 kb gesRNA-Isolierung BOOM et al. (1990): + (Kap. 3.5.1) PCR mit Oak Cryp Primern: + (Kap. 3.5.4)
E 1724	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 100 g	symptomlos	NDS, RFö Hopels, Abt. 1500	31/05/2004	-80°C	dsRNA-Isolierung: - EM: - Nukleokapsidisolierung: Protein 54 kda (Kap. 3.4.2)
E 1739	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 5 g	Ringflecken, Mehltau	B 1	17/06/2004	-	Inokulation (frisch): - EM: isom. P. 30 u. 35 nm
E 1740	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 5 g	Ringflecken, Saugschäden	B 1	17/06/2004	-	Inokulation (frisch): -
E 1741	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 5 g	symptomlos	B 1	17/06/2004	-	Inokulation (frisch): - EM: -
E 1743	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 10 g	Ringflecken	B 1	17/06/2004	-80°C	Inokulation (frisch): - EM: isom. P. 30 nm (Kap. 3.3) gesRNA-Isolierung BOOM et al. (1990): +
E 1744	Stieleiche Einzelbaum	Blätter 5 g	verlaufende Chlorosen	B 1	17/06/2004	-80°C	Inokulation (frisch): -
E 1782	Stieleiche Mischprobe	Blätter 20 g	Ringflecken, Chlorosen	MV, Neusamid	14/08/05	-80°C	gesRNA-Isolierung BOOM et al. (1990): + (Kap. 3.5.1)
E 1200	Holunder Einzelgehölz	Blätter 3 g	Ringflecken, Linienmuster	B 1	7/11/03	-80°C	gesRNA-Isolierung BOOM et al. (1990): +

Danksagung

Frau Prof. Dr. C. Büttner danke ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die Finanzierung der Arbeiten, wodurch ich mich frei entfalten konnte. Ich danke ihr für das stetige Interesse an meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. H.-P. Mühlbach möchte ich sehr herzlich für meinen spannenden und aufschlussreichen Forschungsaufenthalt in Hamburg, seine Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Frau Dr. M. Bandte hat mich während der gesamten Arbeit durch ihre Kenntnisse zu den virologischen Arbeiten an der Stieleiche unterstützt. Mein besonderer Dank gilt ihrer guten Zusammenarbeit bei den Probenahmen und ihrer Unterstützung bei der Niederschrift der Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich Frau Dr. N. Mielke für die tolle Zusammenarbeit in Hamburg. Ihre erstklassige Unterstützung und anregende Diskussion haben mich bei den Arbeiten mit der dsRNA wesentlich vorangebracht.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. S. von Barga, durch die ich eine hervorragende Betreuung bei der Klonierung und Auswertung der Sequenzen der dsRNA erhielt. Ihr Interesse und Engagement haben mir besonders bei der Niederschrift der Arbeit Rückhalt gegeben. Ihre Ideen und Denkanstöße trugen wesentlich zum Gelingen der Arbeit bei.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Dr. C. Obermeier bedanken. Er hat mich gefordert wo es möglich war. Seine Begeisterungsfähigkeit und Diskussionsbereitschaft gaben mir immer neue Motivation auch in fachlich nicht so erfolgreichen Momenten.

Ich danke allen Studenten, Diplomanden und Doktoranden, die für eine sehr nette und entspannte Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Ganz besonders gilt mein Dank an dieser Stelle Herrn M. Rott, der den größten Teil der dsRNA-Isolierungen aus dieser Arbeit übernommen hat und Frau Dr. K. Rebenstorf für die Hilfe bei den Sequenzanalysen.

Den Mitarbeitern des Fachgebietes Phytomedizin danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität. Frau G. Budruss unterstützte mich bei vielen Labor- und Gewächshausarbeiten. Frau R. Junge stand mir stets mit viel Geduld am Elektronenmikroskop zur Seite.

Grundlage meiner Arbeit sind die Freilandproben, die ich freundlicherweise auf Flächen (in Abteilungen) der Forstämter Arnsberg, Braunschweig (RFö Kampen),

Dresden-Nord, Hilchenbach, Neuenburg (RFÖ Hopels), Rantzau und den Revierförstereien Hakenfelde (Berlin-Spandau), Radeland (Berlin-Spandau), Dachsberg (Berlin-Grunewald), sowie dem Hamburger Staatsforst Klövensteen entnehmen konnte.

Ferner gilt mein Dank natürlich allen Freundinnen und Freunden sowie meiner Familie, die in jeder Situation für mich da waren.

Meine Doktorandenstelle wurde durch ein Stipendium des Berliner Programms zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre (Aktenzeichen: N-16/02/01) finanziert. Ein ganz herzliches Dankeschön Frau Dr. B. Meister, Frau S. Krupsack-Dabel und Frau S. Grund für ihre Betreuung und Unterstützung in besonders schwierigen Zeiten und für das Angebot des Workshops, der einen regen Austausch mit anderen Stipendiatinnen ermöglichte.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie alle wörtlichen oder sinngemäß übernommenen Stellen in der Arbeit gekennzeichnet habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Dresden, den 05.09.2005

Sabine Hahn